

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA
INSTITUUT MOLEKULAARBIOLOOGIA
ÕPPETOOL

Pavel Volõnkin

***Escherichia coli* ribosoomi valgu bL31 paraloogide
tähtsusest stressitingimustel**

40 EAP

magistritöö

Juhendajad: *Ph.D* Aivar Liiv
MSc Silva Lilleorg

TARTU 2018

INFOLEHT

***Escherichia coli* ribosoomi valgu bL31 paraloogide tähtsusest stressitingimustel**

Ribosoom on suur konserveerunud rRNA-valk kompleks, mis viib läbi translatsiooni. Prokarüootne 70S ribosoom koosneb suurest 50S ja väiksest 30S subühikust, mis interakteeruvad teineteisega 12 ribosoomi silla kaudu. Sillakontaktid võivad olla moodustatud RNA-RNA, valk-RNA ja valk-valk interaktsioonide poolt. Ainukese valk-valk interaktsiooniga B1b alamühikuvahelisse silla komponentiks on ribosomaalsed valgud uS19, uS13, uL5 ja bL31. bL31 on üks kahest ribosomaalse valgu geenist, mis on duplitseerinud ehk omab paraloogi *E. coli* genoomis. Olenevalt CxxC tsinkisiduva motiivi järjestuse olemasolust geenid nimetatakse paralooge vastavalt bL31A (CxxC+) ja bL31B (CxxC-). bL31A asub ribosoomides valdavalt rakukultuuri kasvu alguses. Eelnevatest töödest on teada, et toitainetevaeses ja oksüdatiivse stressi keskkonnas toimub ribosoomis bL31A paraloogi vahetus bL31B vastu. Antud töös selgitati *E. coli* L31 r-valgu paraloogide bL31A ja bL31B rolli stressitingimustes. Selleks uuriti ribosoomi valgulist koostist lühiajalises stressitingimustes massispektromeetria abil, kasvufenotüüpi pideva stressi ajal ja translatsiooni täpsust *in vivo*

Märksõnad: ribosoom, alamühikutevahelised sillad, paraloogid, oksüdatiivne stress.

CERCS kood: P320 Nukleiinhappesüntees, proteiinisüntees

On the importance of ribosomal protein bL31 paralogs in stress conditions

Ribosome is a big conserved rRNA-protein complex which catalyses protein synthesis. Prokaryotic 70S ribosome consists of a large 50S and a small 30S subunit, which are held together by 12 intersubunit bridges. Bridge contacts may be formed by RNA-RNA, RNA-protein and protein-protein interactions. Bridge B1b is the only protein-protein interaction bridge that consists of proteins uS19, uS13, uL5 and bL31. bL31 is one of two ribosomal proteins whose genes are duplicated in *E. coli* genome, different forms of which are called paralogs. Depending on the presence or absence of CxxC zinc-binding motif in the gene paralogs are named either bL31A (CxxC+) or bL31B (CxxC-). bL31A is predominantly found in exponential growth phase ribosomes. However, it is previously known that during stationary phase, when nutrition is limited and oxidation level is high, bL31A is being replaced by bL31B. This study aimed to clarify the roles of bL31 paralogs in stress conditions. To do this, we analysed ribosomal protein composition after sudden oxidative stress, growth phenotypes during constant stress and translational fidelity *in vivo*.

Keywords: ribosome, intersubunit bridges, paralogs, oxidative stress.

CERCS research specialization: P320 Nucleic acids, protein synthesis.

SISUKORD

INFOLEHT	2
SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1. Prokarüootne ribosoom	7
1.1. 50S	7
1.2. 30S	9
1.3. Alamühikuvahelised sillad	11
1.4. B1b sild	12
1.5. Ribosomaalsed valgud	14
1.6. Ribosomaalsete valkude heterogeensus	15
1.7. Valk bL31 paraloogid	17
1.8. Ribosoomide osalemine stressivastuses	18
EKSPERIMENTAALNE OSA	25
1. Töö eesmärk	25
2. Materjal ja meetodika	26
2.1. Bakteritüved ja söötmed	26
2.2. bL31 paraloogide koostise määramine oksüdatiivse ribosoomides stressitingimustes	27
2.2.1. Parakvaadi töökonsentratsiooni määramine	27
2.2.2. Rakkude kasvatamine	27
2.2.3. Ribosoomide eraldamine	27
2.2.4. MS tulemuste analüüs	28
2.3. Kasvufenotüüpide analüüs	29
2.3.1. Optimaalne parakvaadi kontsentratsiooni leidmine pideva stressi katsetes ...	29
2.3.2. Generatsiooniaja määramine	29
2.3.3. Tilkkülv analüüs	29
2.4. Translatsioonili täpsuse analüüs <i>in vivo</i>	30
2.4.1. Plasmiidid	30
2.4.2. β -galaktosidaasi aktiivsuse mõõtmine translatsiooni täpsuse mõõtmiseks	30
3. Tulemused ja arutelu	32
3.1. Ribosoomide valguline koostis stressitingimustes	32
3.2. bL31 r-vlagu paraloogide mõju rakukasvule stressitingimustes	39

3.3. bL31 paraloogide mõju translatsiooni täpsusele stressitingimustes	49
KOKKUVÕTE.....	53
SUMMARY	54
KASUTATUD KIRJANDUS	56
LIHTLITSENTS	68

KASUTATUD LÜHENDID

EF-G – elongatsiooni faktor G

DOC – naatrium deoksükolaat

Brij 58 – polüetüleenglükoolheksadeküüleeter

Tet – tetratspkiin

OV puhver – *overlay* puhver

SISSEJUHATUS

Ribosoom on suur ribonukleoproteiinkompleks, mis vastutab valkude sünteesi eest nii prokarüootides kui ka eukarüootides. Prokarüootse 70S ribosoomi koosseisu, mis koosneb suurest 50S ja väiksest 30S alamühikust, kuulub 54 r-valku ja 5S, 16S ja 23S ribosomaalsed RNA-d. rRNA käivatab põhilisi ensümaatilisi protsesse kui peptiidsideme süntees ja r-valgud stabiliseerivad rRNA tertsiaalstruktuuri.

Kuigi ribosoomi koostist peetakse stabiilseks, on mitmed uuringud näidanud, et bakteri rakus võib esineda erinevaid ribosoomi subpopulatsioone. Üks viis ribosoomi struktuurse heterogeensuse saavutamiseks on r-valkude geenide duplikatsioonid ehk paraloogid. *E. coli*'l on senini tuvastatud bL31 ja bL36 paraloogsed valgud – vastavalt bL31A ja bL31B ning bL36A ja bL36B.

bL31 valk on ainukese valk-valk alamühikuvaheliste silla B1b komponent. B1b silla terviklikkus on oluline translatsiooni ajal, et koordineerida väiksema alamühiku konformatsiooni dünaamikat. Eelnevad uuringud on näidanud, et bL31 puudumine rakkudes põhjustab märkimisväärselt ebatäpsemat translatsiooni ja samuti pooldumisaja pikenemist.

On teada, et lisaks transkriptsiooni tasemele toimub stressi talumine ja adapteerumine stressiga ka translatsiooni tasemel. Ribosoom on vajalik toitainevaeguse talumise mehhanismide aktiveerimiseks ja samas ribosoom ise võib olla viidud soikeseisundisse. Lisaks, antitoksiin-toksiin süsteemid võivad moduleerida mutatsioone rRNA-s, mis põhjustab spetsiifilisust mRNA transleerimisel. On näidatud, et bL31B ja bL36B on indutseeritud statsionaarses faasis, kus võtavad aset mitu stressitingimust.

Käesoleva magistritöö kirjanduse osa annab ülevaate prokarüootse ribosoomi struktuurist, sh eriti r-valgust bL31, ribosomaalsetest alamühikuvahelistest sildadest ja ribosoomi osalemisest stressivastuses. Eksperimentaalse osa töö eesmärk on välja selgitada, kas bL31 paraloogide vahel on olemas erinevus adapteerimisel stressitingimustega. Eesmärgi saavutamiseks viidi läbi järgnevad eksperimendid: ribosoomide valgulise koostise massispektromeetriline analüüs lühiajalises stressitingimustes, kasvufenotüübi analüüs pideva stressi ajal ja translatsiooni täpsuse katsed *in vivo*.

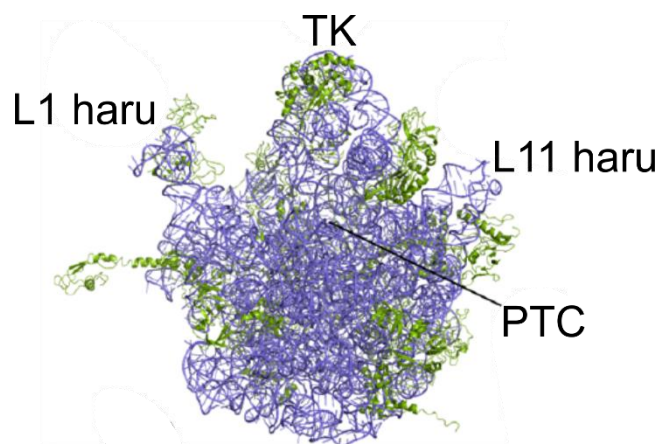
KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1. Prokarüootne ribosoom

Ribosoom on suur kaheosaline ribonukleoproteiinpartikkel, mis transleerib geneetilist koodi kõikides organismides. Nii eukarüootide kui ka prokarüootide ribosoomi alamühikud on erineva suurusega ja neid tähistatakse vastavalt nende sedimentatsioonikoefitsientidele: väike ehk 30S/40S (prokarüoodid/ eukarüoodid) ja suur ehk 50S/60S subühik. Kokku kaks alamühikut moodustavad 70S/80S ribosoomi, millel on 3 tRNA sidumiskohta: aminoatsüül-tRNA seondumiskoht (*A-site*), peptidüül-tRNA seondumiskoht (*P-site*) ja exit-tRNA seondumiskoht (*E-site*) (Grajevskaja *et al.*, 1982; Liu ja Fredrick, 2016; Rheinberger ja Nierhaus, 1983; Rheinberger *et al.*, 1981). *E. coli* 70S ribosoomi läbimõõt on ligikaudu 210 Å ning selle molekulmass on $2,5 \times 10^6$ Da, millest 1/3 moodustavad ribosoomi valgud ja 2/3 rRNA. *E. coli* ribosoomis on kolm ribosomaalset RNA-d (30S alamühikus – 16S; 50S alamühikus – 5S ja 23S) ja 54 ribosomaalset ehk r-valku (Ban *et al.*, 2014; Wilson ja Nierhaus, 2005; Wittmann, 1982)

1.1.50S

Prokarüootse ribosoomi suur (50S) alamühik koosneb kahest rRNA-st – 5S ja 23S – ning 33 r-valgust (L1–36) (Ban *et al.*, 2014; Wittmann, 1982; Yonath, 2002). Suure alamühiku valke märgistatakse prefiksiga L (ingl k. *large*), kuid uue nomenklatuuri järgi lisatakse nii 50S kui ka 30S r-valkude puhul prefiks „u“, kui valk esineb kõikide kolmes domeenis, või prefiks „b“ kui tegu on spetsiifilise bakteriaalse valguga (Ban *et al.*, 2014). 23S rRNA koosneb 2904 nukleotiidist, mis jagatakse sekundaarstruktuuri alusel 7 domeeniks (Petrov *et al.*, 2013; Wittmann, 1982). 5S rRNA, mis on 120 nt pikk, külgneb 23S rRNA II domeeniga. (Petrov *et al.*, 2013; Wittmann, 1982). 5S rRNA interakteerub 23S rRNA-ga uL5 ja bL25 valkude abil (Ban *et al.*, 2000; Wittmann, 1982; Yusupov *et al.*, 2001). 23S rRNA ja 5S rRNA koos suurema alamühiku valkudega moodustavad võrreldes 30S-ga kompaktse struktuuri (Ban *et al.*, 2000). Vaatamata sellele saab eristada kolme distinktiivset elementi: L1 haru, tsentraalne kühm ja L11 haru (Schuwirth *et al.*, 2005; Yusupov *et al.*, 2001).



Joonis 1. 50S alamühiku struktuur vaadatuna väikese subühiku poolt. 50S subühiku moodustavad r- valgud (rohelised) ja rRNA (sinine). Joonisel on viidatud suure subühiku morfoloogilised tunnused - L1 haru, L11 haru ja tsentraalne kühm. Noolega on toodud esile peptidüültransferaasne tsester (PTC), kus katalüüsitakse peptiidsideme sünteesi. Joonis on adapteeritud artiklist Kahrstrom et al., 2012.

5S ja 23S rRNA V domeeni heeliksid 80–88 moodustavad tsentraalse kühmu, mis asub alamühikute kokkupuutepinna poolt vaadatuna täpselt 50S ülaosas keskel. Koos nende heeliksiga osalevad tsentraalse kühmu formeerumises valgud uL5, uL18, bL25, bL27 ja bL31. (Ban *et al.*, 2000; Gongadze, 2011; Selmer *et al.*, 2006). Subühikute kokkupuutepinna poolt vaadates jääb L1 haru tsentraalsest kühmust vasakule ja koosneb 23S rRNA heeliksidest 76 – 78 ja uL1 r-valgust. (Nikulin *et al.*, 2003). L1 haru (eriti heeliks 77) ja E piirkonna tRNA öla vahel eksisteerib vastastikmõju ning SIIN VAJA KIRJUTADA S7 KOHTA liikumine on vajalik selle piirkonna tRNA vabastamiseks (Nikulin *et al.*, 2003; Yusupov *et al.*, 2001)

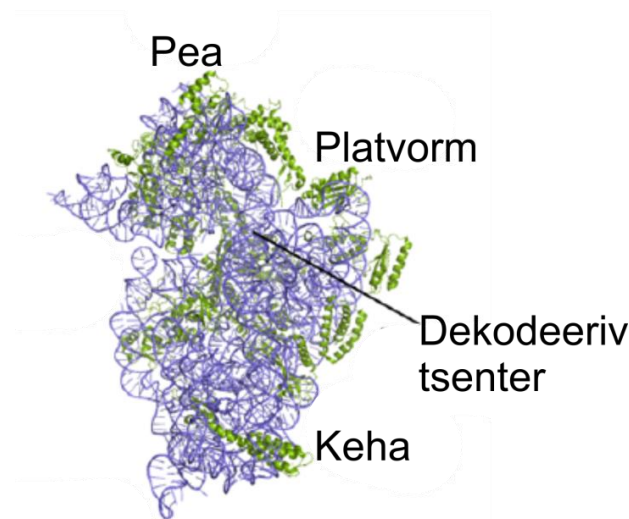
Tsentraalsest kühmust paremal asub L11 haru, mida kutsutakse ka L7/L12 haruks (Diaconu *et al.*, 2005). 23S rRNA osa harust koosneb heeliksidest 42 ja 44, mis interakteeruvad uL10 ja uL11 r-valkudega, kus uL10-ga kontakteerub otseselt (L7/L12)₄ tetrameer ((L7/L12)₄-L10 pentameer) (Diaconu *et al.*, 2005). Translatsiooni ajal seonduvad L11 harus oleva bL12 valgu C-terminusega initsiatsiooni faktor 3 (IF2), elongatsiooni faktor Tu (EF-Tu), elongatsiooni faktor G (EF-G) ja vabanemisfaktor 3 (RF3, *release factor 3*), ja haru suunab neid ribosomaalsete faktorite sidumispiirkonda (Helgstrand *et al.*, 2007).

50S alamühiku tsentraalseks rolliks on peptiidsideme sünteesimine, mis toimub peptidüültransferaases tsentris (PTC, *peptidyl transferase center*) (Polacek ja Mankin, 2005).

Tsenter koosneb valdavalt 23S rRNA V domeenist ja paikneb 70S ribosoomi keskel (Moore ja Steitz, 2003; Noller, 1991; Schuwirth *et al.*, 2005). Sünteesitava peptiidi väljumiseks on ribosoomil olemas 100 Å pikkune ja 25 Å laiune väljumistunnel, mis saab alguse peptidüültransferaasest tsentrist (Kaczanowska ja Rydén-Aulin, 2007). Tunneli seina toetavad uL4, uL22, uL23 ja uL29 r-alkude mitteglobulaarsed osad (Contreras-Martinez *et al.*, 2012).

1.2.30S

Prokarüootse 70S ribosoomi väike 30S alamühik koosneb 1542 nt pikkusest 16S rRNA-st ja 21 r-alkust (S1–S21, S ehk *small*), mis kokku annab sellele molekulaarmassi $8,5 \times 10^5$ Da (Ban *et al.*, 2014; Wittmann, 1982; Yonath, 2002). Sekundaarstruktuuri alusel saab 16S rRNA jagada neljaks suureks domeeniks: tsentraalne domeen, 5' domeen, 3' mažoorne domeen ning 3' minoorne domeen, mis on omavahel ühendatud domeen A abil (Gulen *et al.*, 2016). Erinevalt 50S alamühikust, mis kujutab ennast monoliitsemat struktuuri, moodustab 16S rRNA tertsiaarstruktuur koos alkudega selgesti eristatavaid üksuseid: keha, pea ja platvorm (Wimberly *et al.*, 2000). Lisaks sellele saab ka selgesti defineerida r-alku nende paigutamise järgi väiksemas alamühikus (Wilson ja Nierhaus, 2005; Wimberly *et al.*, 2000). Keha piirkonna moodustavad 23S rRNA 5' ja 3' minoorne domeen ning uS4, uS5, uS12, bS16, uS17 ja bS20 r-alkud (Wilson ja Nierhaus, 2005; Wimberly *et al.*, 2000). 3' mažoorne domeen formeerib koos uS2, uS3, uS7, uS9, uS10, uS13, uS14 ja uS19 r-alkudega 30S subühiku pea osa. Platvormi koosseisu kuuluvad tsentraalne domeen ja bS1, bS6, uS8, uS11, uS15 ja bS18 r-alkud. (Wilson ja Nierhaus, 2005; Wimberly *et al.*, 2000)



Joonis 2. 30S alamühiku struktuur vaadatuna suure subühiku poolt. 16S rRNA (sinine) ja r-valkude (rohelist) poolt moodustatud tersiaalstruktuurid – pea, platvorm ja keha. Joonis on adapteeritud artiklist Kahrstrom et al., 2012.

30S dünaamilised omadused mängivad ka olulist rolli mRNA ja tRNA ühe koodoni võrra edasiliikumisel ribosoomis, mida nimetatakse translokatsiooniks (Ramakrishnan, 2002). Võrreldes suure alamühiku monoliitsema struktuuriga on 30S alamühikul suurem konformatsiooniline paindlikkus, mis on vajalik translokatsiooni ajal (Schuwirth, 2005). Translokatsiooni ajal on oluline, et deatsüleeritud-tRNA liiguks P-seondumiskohast E-seondumiskohta ja polüpeptiid-tRNA liiguks A-seondumiskohast P-seondumiskohasse (Noller, *et al.*, 2017). Selle protsessi ajal peab ribosoom säilitama mRNA lugemisraami, st vältima ribosoomi libisemist mRNA-l (*frameshifting*), mille tulemusena võidakse valed aminohapped valgu koosseisu lülitada ja translatsioon võib enneaegsete stoppkoodonite tõttu vales kohas lõppeda (Noller *et al.*, 2017). Translokatsiooni sujuv kulg on võimalik tänu ribosoomi koordineeritud dünaamikale. EF-G vahendusel on 30S võimeline end pöörata 50S suhtes, mida nimetatakse pörkratasliikumiseks (*ratchet movement*) (Noller *et al.*, 2017). Lisaks sellele saab 30S pea pöörata ka ümber oma telje, mida nimetatakse pöörlemiseks (*swivel*) (Noller *et al.*, 2017).

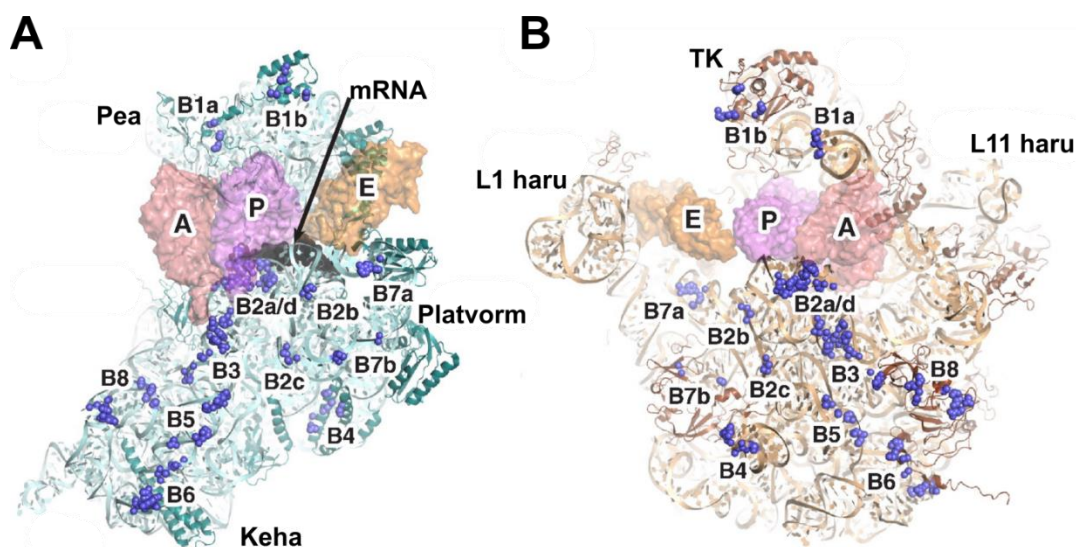
30S alamühiku üheks peamiseks rolliks on mRNA dekodeerimine, kus toimub õige aluspaardumise kontroll mRNA koodoni ja tRNA antikoodoni vahel (Carter *et al.*, 2000). Dekodeerimises mängivad olulist rolli kaks 3' minoorse domeeni nukleotiidi A1492 ja A1493 ning tsentraalse domeeni nukleotiid G530 (J. M. Ogle *et al.*, 2001). Need nukleotiidid

kontrollivad kolme koodon-antikoodon aluspaari geomeetriat, et eristada õiget aluspaardumist valepaardumisest (J. M. Ogle *et al.*, 2001).

Väike alamühik on translatsiooni initsiatsiooni põhiühik, kus initsiatsioonikompleksi moodustavad initsiaator-tRNA (fMet-tRNA^{fMet}), initsiatsioonifaktorid 1–3 ja mRNA (Simonetti *et al.*, 2008). Initsiatsioonikompleksi formeerumine algab mRNA seondumisega 30S alamühikule ja selle korrektne seondumine on tagatud mRNA 5' otsa oleva Shine-Dalgarno (SD) paarumisega 16S rRNA 3' domeenis oleva anti-Shine Dalgarno (anti-SD) järjestusega (Yusupova *et al.*, 2001).

1.3. Alamühikuvahelised sillad

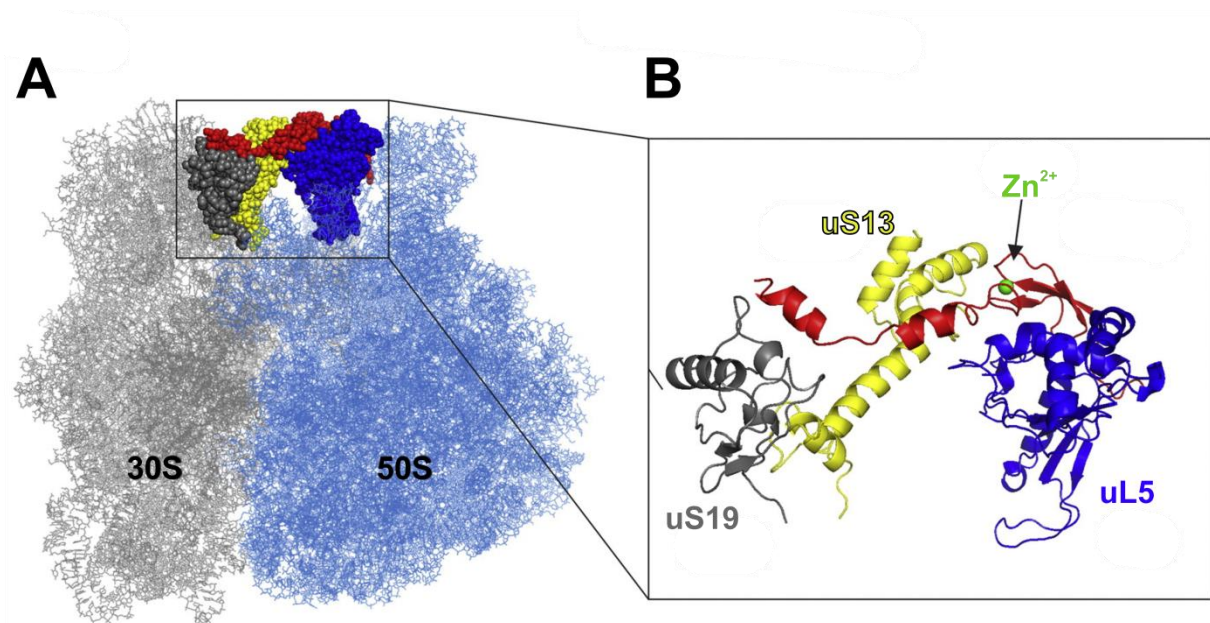
70S ribosoomi formeerumist 50S ja 30S alamühikutest teostavad subühikute vahelised sillad (joonis 3, paneelid A ja B), nagu on näidanud varajased krüoelektronmikroskoopia analüüsid ja hiljem tõestanud kõrgema lahutuvusega struktuurid (Liu ja Fredrick 2016) (Frank *et al.*, 1991; Frank *et al.*, 1995; Yusupov *et al.*, 2001). Varajaste uuringutega leiti ainult RNA-RNA sildu (Frank *et al.*, 1995, 1991). Hiljem avastati, et sildade interaktsioonid koosnevad ka RNA- Valk ja valk-valk kontaktidest (Liu ja Fredrick, 2016; Yusupov *et al.*, 2001). Kõik 12 prokarüootset alamühikühikute vahelistest silda on konserveerunud *Saccharomyces cerevisiae* tsütoplasma (Ben-Shem *et al.*, 2011) ja kuus imetajate mitokondri ribosoomiga (Sharma *et al.*, 2003). Sillad ühendavad subühikuid ja hoiavad neid õiges positsioonis translatsiooni ajal (Liu ja Fredrick, 2016) – seega on sillad dünaamilised ja liiguvad translokatsiooni ajal (Tama *et al.*, 2003). See omakorda võimaldab 30S ja 50S alamühikute nihutamist teineteise suhtes, kuid läbi viia ka alamühiku sisemist dünaamikat (H. Gao *et al.*, 2003). Sildade funktsioonide juurde võib lisada ka initsiatsioonifaktori 3 (IF3) (Dallas ja Noller, 2001) ning ribosomaalse retsükleerimise faktori (RRF) ribosoomi vahelisele interaktsioonile (Gao *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2005).



Joonis 3. Prokarüootsed alamühikuvahelised sillad. 30S (A) ja 50S (B) alamühikuvaheliste sildade komponendid (sinised kerad) on näidatud alamühikute kokkupuutepinna vaatest. Nii 30S kui ka 50S puhul on näidatud tRNA sidumise mudelid (A) mRNA (must) on seotud 30S alamühikuga. 30S alamühiku puhul on välja toodud struktuurilised iseärasused: pea, keha ja platvorm (A). 30S alamühiku struktuurilised iseärasused L1 haru, tsentraalne kühm (TK) ja L11 haru. Joonis on kohandatud artiklist Liu ja Frederick, 2016 (PDB 2WDL ja 2WDL)

1.4.B1b sild

Ribosomaalne sild B1b pakus huvi mitmele teadlastele, kuna kõikide kaheteistkümnest alamühiku vahelistest sildadest, see on ainus valk-valk interaktsiooniga sild (Gao *et al.*, 2003; Yusupov *et al.*, 2001). Lisaks sellele on näidatud, et B1b silla r-valgud ulatavad tRNA antikoodonite A- ja P-seondumiskohtades ning osalevad kognetiivse A-piirkonna tRNA stabiliseerimisel (Jenner *et al.*, 2010). Koos B1b sillaga, osaleb selles regulatsioonis, ka sild B1a, mis on üks seitsmest RNA-valk sillast. B1a sild koosneb 30S alamühiku 50S alamühiku heeliksist 38 (H38) ja uS13 r-valgust, mis kulub ka B1b koosseisu (Jenner *et al.*, 2010; Yusupov *et al.*, 2001). Nii B1b kui ka B1a sild ühendab ribosoomi 50S alamühiku keskse kühmu ja 30S alamühiku pea (joonis 4, paneel A)(Gao *et al.*, 2003; Yusupov *et al.*, 2001). Silla moodustavad 30S poolt uS13 ja uS19 ning 50S poolt uL5 ja bL31, mis ühendab uL5 ja uS13 r-valke (joonis 4, paneel B)(Jenner *et al.*, 2010). bL31 N-terminus kontakteerub uL5 ribosomaalse valguga ja 5S rRNA-ga ning C-terminus uS13-ga (joonis 4, paneel B) (Jenner *et al.*, 2010).



Joonis 4. Ribosomaalne sild B1b pre-translokatsioon seisundis 70S ribosoomis. (A) *E. coli* 70S alamühik, kus sinisena on toodud esile 50S alamühik ja hallina 30S alamühik. B1b silla koosseisu kuuluvad väiksema alamühiku valgud uS13 (kollane) ja uS19 (hall) ning suurema alamühiku valgud bL31 (punane) ja uL5 (tumesinine). (B) B1b silla suurendatud vaade, kus r-valgud on värvitud samuti kui (A) joonise puhul. bL31 seob ühte tsinkiooni. Joonis kohandatud artiklist Lilleorg *et al.* 2017 (PDB 5AFI)

Mõlemad sillad asuvad ribosoomi piirkonnas, mis on väga dünaamiline translokatsiooni ajal (Noller *et al.*, 2017). Pärast peptiidsideme loomist toimub deatsüleeritud tRNA liikumine P-seondumiskohast E-seondumiskohta ja polüatsüleeritud A-seondumiskoha tRNA liigub P-seondumiskohta (Noller *et al.*, 2017). Selle protsessi läbiviimiseks peab ribosoom läbima mitu konformatsioonilist muutust. Translokatsiooni alguses seondub ribosoomiga EF-G-GTP, mis stabiliseerib tRNA-de hübriidseisundi, kus 30S alamühik on pööratud 50S suhtes 6 kraadi vasakule ja 30S pea 6 kraadi (Noller *et al.*, 2017). Alamühikute sellise üksteise suhtes paiknemise tõttu asuvad tRNA-d korraga kahes seondumiskohas: polüpeptiid-tRNA paikneb 30S A-seondumiskohas ja 50S P-seondumiskohas (A/P hübriidseisund) ning deatsüleeritud-tRNA asub 30S P-seondumiskohas ja 50S E-seondumiskohas (Noller *et al.*, 2017). GTP hüdroolüüs põhjustab kimäärseisundi, kus 30S pea pöörab veel 21 kraadi ja 30S alamühik 2 kraadi võõra võrra. Pärast EF-G-GDP eraldumist ribosoomist, polüpeptiid-tRNA asub nii 30S kui ka 50S P-seondumiskohas ja deatsüleeritud-tRNA nii 30S kui ka 50S E-seondumiskohas (Noller *et al.*, 2017). 50S ja 30S alamühikute struktuurid taastatakse pre-translokatsiooni

seisundisse. B1b silla bL31 valgu konformatsiooniline dünaamika ja nõrk seotus ribosoomiga võimaldavad sellel sillal olla kõige dünaamilisem sild (Zhang 2009) (Eistetter *et al.*, 1999.; Fischer *et al.*, 2015), mis jääb erinevalt B1a sillast, kus side H38 ja uS13 vahel katkeb, terviklikuks kogu translokatsiooni ajal (Eistetter *et al.*, 1999; Fischer *et al.*, 2015).

B1b silla olulisust ribosoomi funktsioneerimiseks on näidatud nii *in vitro* kui ka *in vivo* katsetega (Cukras ja Green, 2005; Lilleorg *et al.*, 2017). B1b sild on oluline 70S alamühikute assotsiatsiooni stabiliseerimisel, kuna silla lõhkumine kas bL31 või uS13 puudumise tõttu kahjustab oluliselt ribosoomide alamühikute assotsieerumist 70S ribosoomiks ja vajab suurema Mg^{2+} kontsentratsiooni assotsieerimiseks *in vitro* (Cukras ja Green, 2005; Lilleorg *et al.*, 2017). B1b silla lõhkumine vähendab ka ribosoomide võimet initsieerida translatsiooni 38% võrra ja põhjustab kuni 20-kordset valgusünteesivigade teket (Cukras ja Green, 2005; Lilleorg *et al.*, 2017).

1.5. Ribosomaalsed valgud

Ligikaudu 1/3 bakteri ribosoomi massist moodustavad ribosomaalsed valgud. Kuigi alguses arvati, et r-valgud mängivad kesket rolli ribosoomi ensümaatilises töös, siis praegu on teada, et r-valkudel on enamasti rRNA struktuuri stabiliseeriv roll nii 50S kui ka 30S puhul (klein 2004, wimberley 2003, Wilson nierhaus 2005). Ribosomaalsed valgud asuvad ribosoomis stöhhiomeetriliselt, st ühes korduses, välja arvatud $(L7/L12)_4$ (Wilson ja Nierhaus, 2005; Yusupova *et al.*, 2001)

Ribosomaalsete valkude isoelektriline punkti (pI) väärtus on keskmiselt 10,1, mis annab neile aluselised omadused. Niisugust pI saavutatakse tänu sellele, et 20% kõikidest aminohapetest on lüsiin ja arginiin (Noller ja nomura 1996). Ribosomaalsete valkude aluselisus võimaldab neil neutraliseerida rRNA fosfaatselgroo negatiivset laengut. Samas, osade r-valkude funktsioneerimiseks on oluline interakteeruda teiste r-valkudega, mida saavutatakse happeliste omaduste abil. Nendeks r-valkudeks on bS1, bS6 ja $(L7/L12)_4$, mille primaarjärjestuse koosseisus on 10% glütsiini ja mille pI väärtus on 4-5 vahel (Wilson nierhaus 2005, wittman 1982).

R-valgud paiknevad ribosoomis ebaproportsionaalselt: enamus valke asub ribosoomi solvendipoolsel pinnal (Wilson ja Nierhaus, 2005). Enamuse ribosomaalsete valkude koosseisus on olemas vähemalt üks solvendi poole pööratud globulaarne domeen, millest ulatub ribosoomi sisse struktuuritu jätke. Viimane võtab õige konformatsiooni ainult ribosoomi koosseisus (Wilson ja Nierhaus, 2005). Need pikad jätked võivad võtta struktuuritu ling kuju valgu N- või C-terminuse otsas, kuid võivad leida aset ka valgu keskosa α -heeliksis või β -lehes (Wilson ja Nierhaus, 2005). Selline struktuuri olukord on leitud kõikidel 30S (v.a uS4 ja uS15) ja peaaegu poolel 50S alamühiku valkudel (Wilson ja Nierhaus, 2005). Glütsiini olemasolu annab struktuuritule jätkele paindlikkuse ja võimaldab seda tihedamini pakkida, aluselised jätked võimaldavad valgul interakteeruda rRNA-ga (Wilson ja Nierhaus, 2005).

R-valkude geenid on paigutunud mitmetesse operonidesse, kusjuures 33 ribosomaalse valkude geeni 54-st paikneb L11, str, S10, spc, β ja α operonides (Aseev ja Boni, 2011). Nii nendes kui ka teistes r-valkude operonides võib lisaks leida RNA polümeraasi alamühikuid, replikatsioonikompleksi komponente kodeerivad geene ja geene, mis on seotud tRNA modifitseerimise ja töötlemine, rRNA küpsemisega, samuti transpordisüsteemi valke nagu SecY (Aseev ja Boni, 2011; Ikegami *et al.*, 2005). SecY valk on Sec translokatsiooni süsteemi SecYEG transpordi läbiviiva kanali osa (Albers *et al.*, 2006). Enamike operonide ekspressiooni reguleerivad samasse operononi kuuluvad r-valgud, mis võimaldab kooskõlastada r-valkude stöhhiomeetrilist sünteesi ribosoomi küpsemisega. Enamikke operone reguleerivad r-valgud, mis tagab selle, et r-valkude geene transkribeeritakse vastavalt ribosoomide biogeneesi vajadusele (Mattheakis ja Nomura, 1988). Üks *Rpst*, *rpsB-tsfc*, *rpsA*, *rpml-rplL*, *rpsO*, *rif*, *L11*, *str*, *S10*, *spc*, β ja α operonide r-valkudest seondub enda operoni polütsistronse mRNA-ga ning käitub kui repressor (Aseev ja Boni, 2011; Mattheakis ja Nomura, 1988). Selline geneetiline informatsiooni avaldumisega seotud geenide kompositsioon viitab sellele, et nende geenide ekspresseerumine peab olema kooskõlas raku funktsioneerimiseks (Aseev ja Boni, 2011).

1.6. Ribosomaalsete valkude heterogeensus

Ribosoomi valkude koosseisu peeti stabiilseks, kuna r-valgud asuvad stöhhiomeetrilises tasakaalus ehk kõikides ribosoomides on teadolev hulk r-valke bakterikultuuri eksponentsiaalse kasvu ajal (Davern ja Meselson, 1960; Dennis, 1974; Robertson *et al.*, 1977). 1970ndate alguses näitasid uurijad, et *E. coli* ribosoomides on olemas kasvukiirusest olenev (kultuure kasvatati vaeses ja rikkas söötmes) bS6, bS21 ja bL12 ribosomaalsete valkude stöhhiomeetria muutus,

mille tulemused on ka kooskõlas ka hilisemate katsetega (Deusser, 1972; Deusser ja Wittmann, 1972; Milne *et al.*, 1975; Weber, 1972). Lisaks sellele, kanooniliste mRNA translatsiooni initsiatsiooni jaoks oluline valk bS1 asub substõhhiomeetrilistes kogustes 70S ribosoomides (Sørensen *et al.*, 1998; van Duin ja van Knippenberg, 1974; van Knippenberg *et al.*, 1974). Hiljuti on leitud, et 70S ribosoomide alampopulatsioon, kus puudub bS1 valk, on võimeline transleerima liiderjärjestuseta mRNA-d, mis funktsionaalselt heterogeensete ribosoomide populatsioone (*leaderless* mRNA) (Byrgazov *et al.*, 2012; Moll *et al.*, 2001; Moll *et al.*, 1998; Moll *et al.*, 1998; Moll *et al.*, 2002; Moll *et al.*, 2004).

Lisaks stõhhiomeetrilistele erinevustele võivad ribosoomi valgud erineda posttranslatsiooniliste modifikatsioonide poolest (Nesterchuk *et al.*, 2011). uS11, uL3, uL11, bL7/L12, uL16, ja bL33 metüleeritakse, samal ajal kui uS5, bS18 ja bL7 atsetüleeritakse ja uS12 lisatakse metültioolrühm, bS6-le lisatakse kuni neli glutamaadi jääki (Nesterchuk *et al.*, 2011). Samas on vähe teada modifikatsioonide rollist. Modifikatsioonid ei ole raku jaoks elutähtsad ja nende puudumine ei põhjusta fenotüübilisi muutusi, kuid arvatavasti on neil regulatoorne roll (Nesterchuk *et al.*, 2011).

Kolmas teadaolev viis r-valkude mitmekesisuse suurendamiseks on nende paraloogsed geenid ehk geeniduplikatsiooni tagajärjel tekkinud homoloogsed geenid, mis paiknevad sama liigi kromosoomis (Makarova *et al.*, 2001). Kogu sellist r-valkude varieeruvust nimetatakse ribosomaalsete valkude heterogeensuseks (Ramagopal, 1992). Lähtuvalt käesoleva töö fookusest bL31 paraloogidele leiab pikemat käsitlust just paraloogide teema.

Iga uL11, bL28, L7/L12, bS1, uS15 ja bS18 ribosomaalsete valkude geenidest on duplitseeritud ainult ühes genoomis (Makarova *et al.*, 2001). Nende valkude geenid paistavad nagu sugupuuspetsiifilised duplikatsioonid ilma horisontaalse geeni ülekandeta (Makarova *et al.*, 2001). Samas, bL36, bL33, bL31 ja uS14 geenide paraloogid tekkisid eeldatavasti mitmes genoomis ja nende geenide järjestuses esineb suuri liikidevahelisi sarnasusi (Makarova *et al.*, 2001), mis viitab nende geenide ühele duplikatsioonile evolutsiooni jooksul (Makarova *et al.*, 2001). Edasised uuringud näitasid, et bL36, bL33, bL31, uS14, bS18, bL32 ja bL28 valkude geenid esinevad kahe variandina, kus üks variant saab siduda tsinki ja teine mitte (Makarova *et al.*, 2001). Tsingi sidumine on saavutatud kahe konserveerunud tsüsteiini paari kaudu (CxxC motiiv), kusjuures üks tsüsteiin võib olla asendatud histidiiniga nagu bL36 puhul (Makarova *et*

al., 2001). Fülogeneetiliselt on just tsinki siduv valk vanem, kuna piisab ainult ühe tsüsteiini väljavahetamisest, et rikkuda r-valgu tsingi sidumisvõime (Makarova *et al.*, 2001).

Need bL36, bL33, bL31 ja uS14 r-valkude paraloogid, mis ei seo tsinki, asuvad ka Zur valgu (*Zinc uptake regulation protein*) kontrolli all (Owen *et al.*, 2007; Panina *et al.*, 2003). Zur on tsingi kontsentratsiooni suhtes tundlik regulatoorne valk, mis kontrollib selle metalliooni transporti nii rakku kui ka rakust välja, represseerides Zn^{2+} liia korral tsingi transportvalkude transkriptsiooni (Brocklehurst *et al.*, 1999; Gaballa, *et al.*, 2002; Patzer ja Hantke, 1998). Kui tekib tsingivaegus, derepreseeritakse Zur repressori kontrolli all olevad operonid, mille produktid tõstavad Zn^{2+} kontsentratsiooni rakus sees, või valgud ka, mis ei nõua töö jaoks Zn^{2+} (Patzer ja Hantke, 1998). Selline nelja r-valgu geenide regulatsiooniviis lubas Paninal ja kolleegidel spekuloida, et tsingipuudus stimuleerib tsinki mittesiduvate valkude inkorporeerimist ribosoomi. Ribosoomidest vabastatud tsinki saavad kasutada oma koosseisus need valgud, mis seda oma aktiivsuseks vajavad. Uuringud on tõestanud, et *B. subtilis* bL31A osakaal ribosoomides väheneb miinimumini statsionaarses faasis, kuna tsingivaeguse tõttu sellel faasil Zur derepresseerub bL31B valgu geenist ja toimub selle r-valgu inkorporeerimine ribosoomi (Akanuma *et al.*, 2006; Nanamiya *et al.*, 2004). bL31B omab võrreldes bL31A-ga suurema võimekust siduda ribosoomiga, mis põhjustab võib aktiivset paraloogide vahetust (Akanuma *et al.*, 2006; Nanamiya *et al.*, 2004).

1.7. Valk bL31 paraloogid

Ribosomaalne valk bL31 kulub B1b alamühikuvahelise silla ja ühendab 50S ja 30S silla komponente enda vahel (Jenner *et al.*, 2010). Arvatakse, et bL31 võib mängida esialgset rolli 30S pea pöörlemises uS13 ja uS19 kaudu (Jenner *et al.*, 2010). Kõikidest eelpoolkirjeldatud ribosomaalsete valkude geenide paraloogidest, esinevad *E. coli* genoomis ainult bL31 ja bL36 oma (Makarova *et al.*, 2001). Ribosomaalse valgu bL31 geeniduplikatsioone nimetatakse vastavalt tsingisidumise CxxC motiivi olemasolule valgul: bL31A (CxxC+) ja bL31B (CxxC-) (Makarova *et al.*, 2001). bL31A on kõrgelt konserveerunud tsinki siduv bakteriaalne valk, mida kodeerivad isegi kõige väiksemad geenoomid nagu *Mycoplasma* (Ueta *et al.*, 2017). bL31A asub *rpmE* operonis, mis kodeerib ainult bL31A valku (Aseev ja Boni, 2011). Võrreldes teiste r-valkude operonidega ei ole teada täpset ekspressiooni kontrollimehhanismi, sealhulgas seda, kas valk ise represseerib enda sünteesi. On aga teada, et stressitingimustel on pärsitud klass I

RelA toimel *rpmE* operoni ekspressioon (Eymann *et al.*, 2002). bL31A koosneb 70 aminohappest (7871,1 Da), millest 18,5% moodustavad lüsiini ja arginiini jäägid, mis annavad aluselised omadused (pI 9,46) (Plunkett *et al.*, 1993). Bioinformaatiliste ennususte järgi on teada, et bL31A sisaldab CxxC motiivi, ja *in vivo* katsete kaudu teatakse, et see on võimeline siduma ühe tsinkiooni. (plunket, nanimaya). bL31A puhul on näidatud, et see selle r-valgu olemasolu ribosoomis annab rohkem vastupidavust ja pärsib 70S dissatseerimist ribosoomi sisemise destabiliseerimise fenomeeni puhul (IRD, *intrinsic ribosome destabilization*). ribosoomi sisemise destabiliseerimise, nimetatakse protsessi, kus spetsiifiline kasvava peptiidi järjestus võib põhjustada 70S dissasotsiooni (Chadani *et al.*, 2017).

bL31A r-valgu paraloogi bL31B geen *ykgM* asub Zur repressori kontrolli all olevas *ykgMO* operonis (Hemm *et al.*, 2010; Panina *et al.*, 2003). Valgu pikkus on 87 aminohapet, mis annab talle molekulmassi 9 920 Da (Uniprot). Geenijärjestuse põhjal on ennustatud, et erinevalt bL31A-st ei sisalda bL31B tsinki siduvat CxxC motiivi ja on seetõttu võimetu siduma Zn²⁺ (Hensley *et al.*, 2012; Makarova *et al.*, 2001). bL31B valgu puudumine ribosoomidest põhjustas rakkudel vähenenud Zn taseme defitsiidi ja *curli*-filamentide geenide ekspressiooni (Lim *et al.*, 2011). *Curli* puudumine bakteri pinnalt põhjustab vähenenud nii abiootilise kui ka biootilise pinnaga sidumist, mis on äga oluline samm biofilimi loomises (Lim *et al.*, 2011).

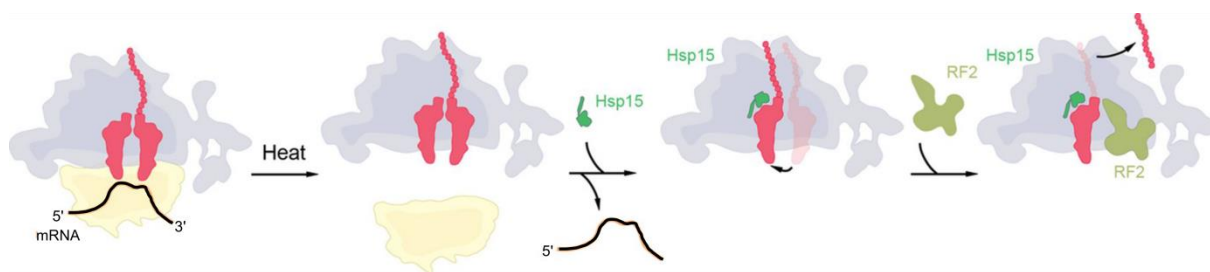
1.8. Ribosoomide osalemine stressivastuses

Bakteriaalse stressi vastust võib defineerida kui muutusi geeniekspressioonis ja valkude aktiivsuses, et püsida ja jääda ellu ekstreemses kiiresti muutuv ja potentsiaalselt kahjustavas keskkonnas. Selle tulemusena bakterirakud üldiselt saavad stressile vastupidavamaks, kõrvaldavad stressi põhjuse ja/või vahendavad rakukahjustuse parandamist (Giuliodori *et al.*, 2007). Levinumad stressitüübid on temperatuurišokk, nii külma- kui kuumašokk, oksüdatiivne stress ja toitainete vaegus, mis on seotud kas statsionaarse kasvufaasi või keskkonnatingimuste muutustega.

Geeni tasemel reguleerib stressivastust suur hulk erinevaid sigmafaktoreid (σ -faktor), kus kõige olulisem on RpoS (σ^S), mis aktiveerib olulisi geene statsionaarse faasi või toitainete vaeguse talumise jaoks (Gentry *et al.*, 1993; Klauck *et al.*, 2007). Kuumašoki ajal aktiveerib vajalikke geene RpoH (σ^{32}), mis on stabiilne kõrgetel temperatuuridel (Arsène *et al.*, 2000). Lisaks

sigmafaktoritele osaleb stressivastuses ka ribosoom, modifitseerides teiste faktorite abil translatsiooni (Starosta *et al.*, 2014).

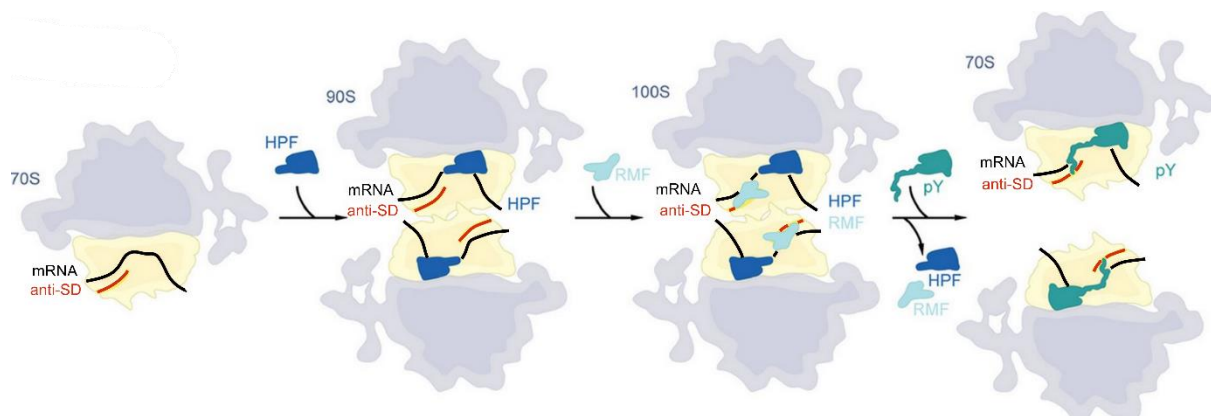
Üks kuumašoki mõjudest seisneb transleerivate ribosoomide subühikute ekslikus/enneaegses dissotsiatsioonis, mille tõttu 50S alamühikusse jääb polüpeptiidiga ühendatud tRNA (joonis 5)(Jiang *et al.*, 2009; Korber *et al.*, 2000). Niisugused 50S alamühikud on kõlbmatud taaskasutuseks translatsiooni taasinitseerimiseks ning vajavad tRNA ja polüpeptiidi vahelise estersideme lõhkumist (Jiang *et al.*, 2009). Seda funktsiooni käivitab kuumašokki valk Hsp15 (*Heat shock protein 15*), mille *yrfH* geeni ekspressioon on ülesreguleeritud 50 korda (Jiang *et al.*, 2009; Korber *et al.*, 2000; Richmond *et al.*, 1999). Peptidüül-tRNA asub A-seondumiskohas ja selle positsioneerimine P-seondumiskohta ning stabiliseerimine Hsp15 abil võimaldab vabanemisfaktoril hüdrolüüsida estersidet (joonis 5)(Jiang *et al.*, 2009; Korber *et al.*, 2000; Richmond *et al.*, 1999). Kõrge vaba 30S ja 50S alamühikute arv rakus aktiveerub ribonukleaase, mis degradeeruvad vabu alamühikuid. Hsp15 taastub 50S alamühikul võime assotsieeruda 30S alamühikuga ja initseerida translatsiooni (Sulthana *et al.*, 2016).



Joonis 5. Ribosoomi taastumine kuumašokist Hsp15 abil. Kuumašokk põhjustab ribosoomide enneaegset dissotsieerumist, mille tõttu tekkinud 50S subühikusse jääb polüpeptiid-tRNA. Hsp15 paigutab polüpeptiid-tRNA A-seondumiskohast P-seondumiskohta, võimaldades RF2-l hüdrolüüsida keemilist sidet peptiidi ja tRNA vahel. Joonis on kohandatud artiklist Starosta *et al.*, 2014.

Temperatuuri alandamine, lisaks sellele, et see mõjutab aktiivset transporti ja valkude sekretsiooni rakumembraani voolavuse vähendamise tõttu, mõjutab ka translatsiooni ja transkriptsiooni efektiivsust (Phadtare, 2004; Phadtare ja Severinov, 2010). RNA ja DNA sekundaarstruktuuride stabiliseerimine madalamatel temperatuuridel võivad olla ebasoodsad polümeraaside ja ribosoomi töö jaoks ja põhjustada nii translatsiooni ja transkriptsiooni taseme

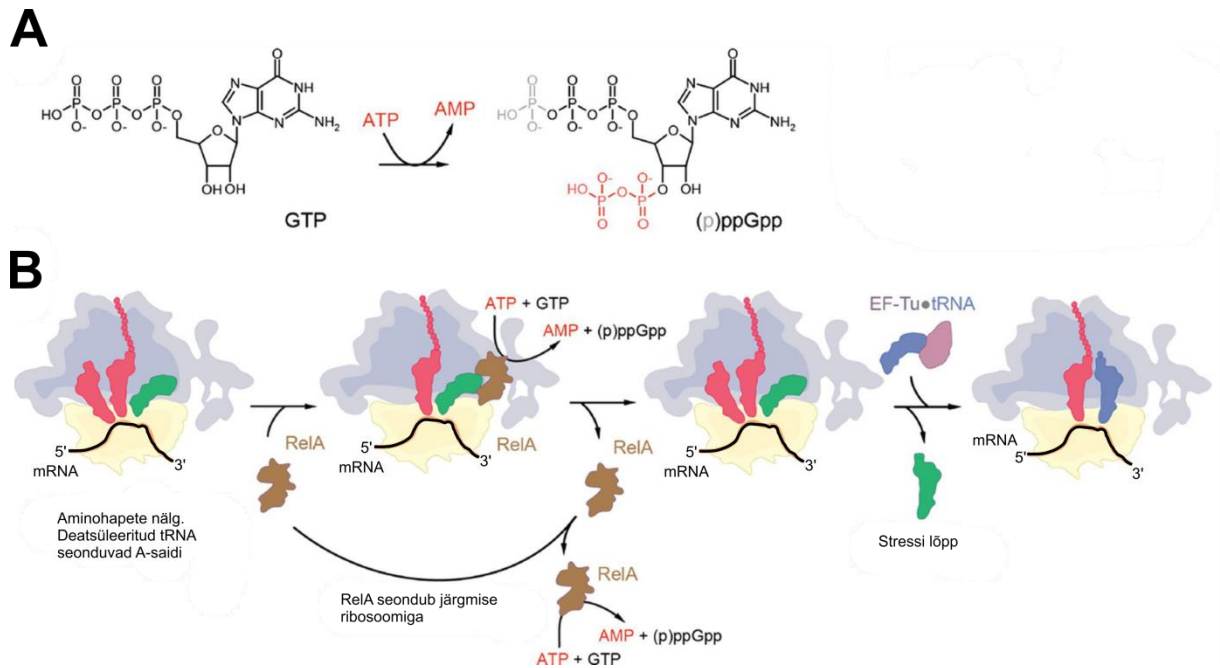
alanemist (Di Pietro *et al.*, 2013; Phadtare, 2004). Lisaks sellele suureneb külmašoki ajal vaba 70S fraktsioon, mis on vabastatud polüsoomidest (Uchida *et al.*, 1970). Niisugustel tingimustel seob 70S väikese alamühikuga valk Y (pY, *protein Y*), mida nimetatakse ka RaiA, ja see põhjustab ribosoomi alamühikute dissotsieerumist (Maki *et al.*, 2000; Vila-Sanjurjo *et al.*, 2004; Agafonov *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2010). pY toimemehhanism seisneb konkurentsias A- ja P-seondumiskoha tRNA-ga, pY inhibeerib translatsiooni ja moodustab inaktiivseid 70S (Agafonov *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2010; Vila-Sanjurjo *et al.*, 2004). Samas, kui soosivad keskkonna tingimused on taastatud, pY dissotsieerub kiiresti ribosoomidest. Niimoodi saab pY abil hoida ribosoomi lagundamisest (Di Pietro *et al.*, 2013; Maki *et al.*, 2000; Vila-Sanjurjo *et al.*, 2004)



Joonis 6. pY ja HPF/RMF ja antogonistlik mõju ribosoomidele stressi ajal. pY ja HPF/RMF omavad vastandlikku mõju ribosoomidele. HPF ja RMF seondumisel ribosoomiga tekivad 30S alamühikute kaudu 70S ribosoomidest dimeerid, samas kui pY stabiliseerib 70S monomeeridena. Nii HPF/RMF kui ka pY-ga ribosoomid on translatsiooniliselt inaktiivsed. Joonis on kohandatud artiklist Starosta *et al.*, 2014.

Toitainete, eriti aminohapete vaegus põhjustab poomisvastust (*stringent response*), mis põhjustab muutusi transkriptsioonis, translatsioonis ja replikatsioonis. Selle protsessi põhiteguriteks on hormoonitaolised molekulid guanosiintetrafosfaat (ppGpp) ja guanosiinpentafosfaat (pppGpp), mida sünteesivad RelA/SpoT perekonna ensüümid ATP-st ja GTP-st (joonis 7, paneel A) (Atkinson *et al.*, 2011; Somerville ja Ahmed, 1979). Molekule nimetatakse kokkuvõtlikult (p)ppGpp. Alarmonni seandumine RNA polümeraasi β subühikule põhjustab niisuguste transkriptsiooni ja translatsiooni masinavärgi komponentide nagu rRNA, r-valgud, süntetaasid ja tRNA geenide transkriptsiooni pärssimist (Dennis, 1974). RelA-d

aktiveerib ribosoom, kus A-seondumiskohta on seondunud deatsüleeritud tRNA, takerdades niimoodi translatsiooni käigu (joonis 7, paneel B)(Starosta *et al.*, 2014). Sünteesitud (p)ppGpp vähendab RelA seondumist ribosoomiga ja RelA saab siduda järgmise blokeeritud ribosoomiga ning korrata (p)ppGpp sünteesi (Starosta *et al.*, 2014).



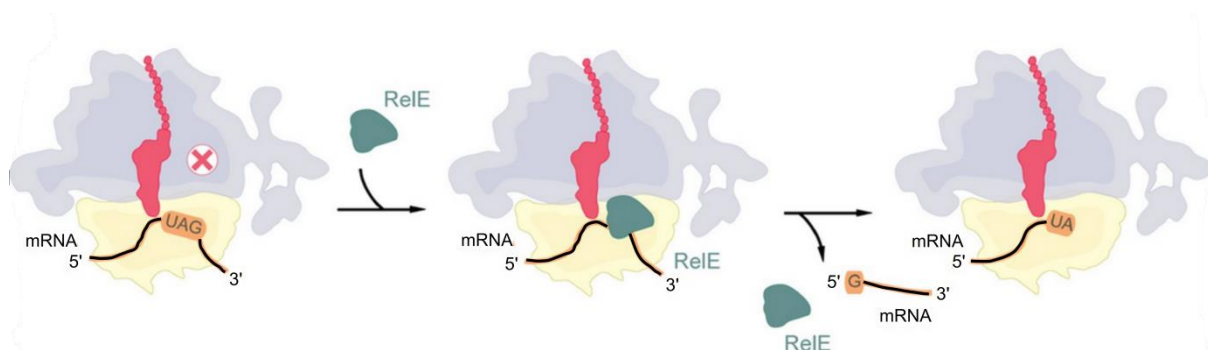
Joonis 7. pppGpp süntees ja ribosoomi osalemine poomisvastuse ajal. (A). Kasutades ATP energiaallikana, sünteesib RelA GTP-st või GDP-st (p)ppGpp. (B). RelA tunneb ära ribosoomi, kus deatsüleeritud tRNA tõttu on translatsioon peatunud. Joonis on kohandatud artiklist Starosta *et al.*, 2014.

(p)ppGpp püsiv süntees, mis võib juba vihjata statsionaarsele faasile, võib põhjustada ribosoomi modulatsiooni faktori (RMF, ingl. k. ribosome modulation factor) ekspressiooni (Izutsu *et al.*, 2001). RMF ise on väike aluseline valk, mis on kõrgelt konserveerunud γ -proteobakterite hõimkonnas (Ueta *et al.*, 2008). Valgu poolt tekitatud 30S pea piirkonna konformatsioonilised muutused pärast väiksele alamühikule seondumist põhjustavad 70S dimeriseerumist 30S alamühiku kaudu, moodustades niimoodi 90S partikleid (Kato *et al.*, 2010; Ortiz *et al.*, 2010; Polikanov *et al.*, 2012; Ueta *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2002). Edasisel HPF valgu liitumisel 90S partiklitele moodustuvad translatsiooniliselt inaktiivsed **100S partiklid** (Ueta *et al.*, 2005, 2008). RMF sidumiskoht asub Shine-Dalgarno anti-Shine-Dalgarno interakteerimise piirkonnas ja HPF sidumiskoht kattub A- ja P- seondumiskoha tRNA ja mRNA-ga (Starosta *et al.*, 2014). Kuna RMF-ta rakkudel kaob elujõulisus statsionaarses faasis

varem kui metsiktüüpi rakkudel, peetakse 100S partiklite moodustamist ribosoomide säilimisseisundiks, et neid lagundamise eest kaitsta – ribosoomide soikumiseks (*ribosome hybernation*). (Izutsu *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2002). Pärast ebasoodsate tingimuste kadumist vabastatakse ribosoomide kompleksist RMF ja HPF ning translatsiooniliselt inaktiivsed 100S muutuvad aktiivseteks 70S ribosoomideks (Aiso *et al.*, 2005; Maki *et al.*, 2000; Wada, 1998). Lisaks eelpool mainitud HPF ja RMF valkudele, 100S formeerumiseks on vajalik bL31, kuna bL31A mutantsetel tüvedel puudus võime formeeruda ribosomaalseid dimeere, arvatavasti 30S pea õige konformatsioon on rikutud (Ueta *et al.*, 2017).

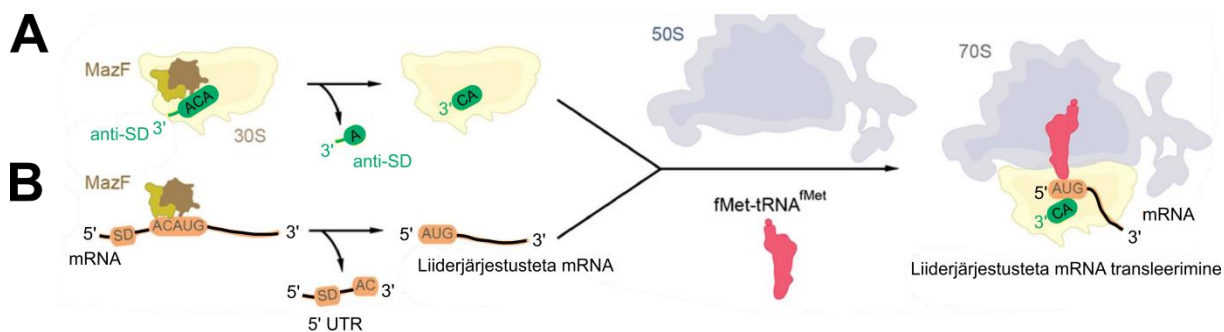
Stressiga kohanemisel ribosoomi vaatenurgast mängivad olulist rolli ka toksiin-antitoksiin süsteemid (Starosta *et al.*, 2014). Üldiselt koosneb see süsteem stabiilsest globulaarsest toksiinist ja kiiresti lagunevast antitoksiinist, mille kontakt toksiiniga inaktiveerib toksiini ja ainult edasine antitoksiini degradatsioon laseb toksiinil toimida (Starosta *et al.*, 2014). Sõltuvalt antitoksiini neutraliseerimise viisist jaotatakse toksiin-antitoksiin süsteemid kuude klassi, millest translatsiooni vaatenurgast on huvitavad klass II süsteemid nagu RelBE ja MazEF (Page ja Peti, 2016; Starosta *et al.*, 2014)

RelBE süsteem koosneb RelB antitoksiinist ja toksiinist RelE, kus toksiini aktiivsus sõltub seondumisest ribosoomiga (Neubauer *et al.*, 2009; Pedersen *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2016). RelB degradatsioon Lon proteaasi poolt, mida aktiveerib (p)ppGpp, aktiveerub RelE ja võimaldab sidumist ribosoomile (Christensen *et al.*, 2001; Galvani, Terry, ja Ishiguro, 2001; Germain *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2009). RelE seob 30S A-seondumiskohas olevasse dekodeerivasse tsentrisse ning lõikab sealset mRNA koodoni 2. ja 3 .positsiooni vahel (Neubauer *et al.*, 2009; Pedersen *et al.*, 2003). Selle tulemusena translatsioon peatub, mis võib pakkuda paar eelist. Energia- ja toiduallikate tarbimist saab kiiresti kohandada vastavalt allikate kättesaadavusele ja samas väiksem translatsiooni initsiatsiooni sagedus ning sellega kaasnev suurem aminoatsüül-tRNA hulk võib tagada väiksema translatsiooniliste vigade sageduse (Gerdes *et al.*, 2005; Nystöm, 1994; O'Farrell, 1978).



Joonis 8. RelBE antitoksiin-toksiin süsteem ja selle ribosoomist sõltuv A-seondumiskoha mRNA koodoni lõikamine. RelE on aktiveeritud sellistel stressitingimustel nagu aminohapete nälg ning seondudes ribosoomiga käitub see valk kui endonukleaaas, mis lõigates A-seondumiskoha mRNA-d peatab translatsiooni. Joonis on kohandatud artiklist Starosta *et al.*, 2014.

Vastupidi, MazEF antitoksiin-toksiin süsteemi toksiin MazF on võimeline lõikama raku mRNA-d, ilma et see oleks seotud ribosoomiga. Ent on näidatud, et MazF'i aktiivsus on suurem ribosoomiga seotud mRNA puhul, tõenäoliselt seepärast, et ribosoom on harutanud lahti mRNA sekundaarstruktuure (Christensen ja Gerdes, 2003; Zhang *et al.*, 2003). MazEF süsteem ise koosneb MazE antitoksiinist ja MazF toksiinist (Starosta *et al.*, 2014). Süsteemi aktiveerivad mitmed stressiolukorrad nagu antibiootikumid, kuumašokk, oksüdatiivne stress ja toitainete nälg (Hazan *et al.*, 2004). Aktivatsiooni põhimõtteks on MazE lõikamine järgneva MazF vabastamisega, mida käivitavad ATP-sõltuv ClpAP seriinproteaaas või (p)ppGpp poolt aktiveeritud Lon proteaas (Aizenman *et al.*, 1996; Christensen ja Gerdes, 2003; Germain *et al.*, 2015). MazF lõikab mRNA-sid, mille tulemusena inhibeeritakse 90% valkude süntees (Amitai *et al.*, 2009). Vesper ja kolleegid (2011) on näidanud, et MazF on võimeline lõikama mRNA ACA järjestust, mis asub AUG-st 5' suunas, ja 16S rRNA-l 43 nukleotiidi järjestust 3' piirkonnas. Selle tulemusena tekib liiderjärjestuseta mRNA ja 16S rRNA ilma Shine-Dalgarno järjestusteta, kuna MazF lõikamise tulemusena kaotatakse heeliks 45 (Vesper *et al.*, 2011). Teadlaste edasised *in vitro* uuringud on näidanud, et need ilma SD järjestusteta ribosoomid on võimelised transleerima mittekanoonilisi liiderjärjestuseta mRNA-sid (Vesper *et al.*, 2011). Niisugused tulemused ribosoomide heterogeensuse kohta võimaldasid teadlastel spekuloida, et need stressiribosoomid võivad selektiivselt transleerida spetsiifilisi mRNA-sid, mille tulemusena võib tõusta rakkude stressitaluvus (Isabella Moll ja Engelberg-Kulka, 2012; Starosta *et al.*, 2014)



Joonis 9. Translatsiooni reprogrammeerimine MazEF toksiin-antitoksiin süsteemi poolt.

(A). MazEF toksiin-antitoksiin süsteemi MazF toksiin on võimeline lõikama 16S rRNA ACA motiivi, lõigates niimoodi anti-SD siseneva 43 heeliksi. B. MazF on võimeline lõikama samuti mRNA 5' ACA järjestust, mis asub AUG startkoodoni juures, ja selle tulemusena tekib liiderjärjestuseta mRNA. Anti-SD-ta ribosoom on võimeline spetsiifiliselt transleerima just liiderjärjestuseta mRNA-d. Joonis on kohandatud artiklist Starosta *et al.*, 2014.

Ribosomaalsete valkude paralooide avastamine tõstetab küsimusi miks on osadel r-valkudel paralooigid. ja mis eelise võiks kahe valguvariandi omamine rakule anda (Makarova *et al.*, 2001; Panina *et al.*, 2003). Põhilise hüpoteesi kohaselt toimib bL31A raku tsingiiooni varuna ja selle metalliiooni vaegusel vahetatakse bL31A tsinki mittesiduva bL31B vastu välja. Selle tulemusena vabaneb rakus tsinki, mida omakorda saavad kasutada sellised ensüümid nagu DNA polümeraas ja primaas ja võiks aidata rakkudel stressiga paremini toime tulla (Makarova *et al.*, 2001; Panina *et al.*, 2003). Valk bL31 asub translokatsiooni jaoks väga olulises kohas ribosoomis ja selle puudumine põhjustab ulatuslikku kasvudefekti (Lilleorg *et al.*, 2017). On juba teada, et tsingi vaeguses ja statsionaarses faasis bL31B paralooig lülitub 70S ribosoomide koosseisu (Nanamiya *et al.*, 2004). Küsimus seisneb selles, kas bL31A vahetus bL31B-ga võib olla üks stressitalumise mehhanismidest?

EKSPERIMENTAALNE OSA

1. Töö eesmärk

Töö laiem eesmärk on välja selgitada ribosomaalse bL31 valgu paraloogide rolli stressitingimustes. bL31 r-valk on ribosomi silla B1b komponent, mis mängib olulist rolli translatsioonil. Toitainetevaeses ja stressirohkes statsionaarses faasis toimub bL31A paraloogi asendamine ribosoomi koosseisust bL31B vastu.

Tööhüpoteesi kohaselt on bL31A vajalik rakkude kiireks kasvuks ning bL31B kohastumiseks stressitingimustega.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks on:

1. Selgitada, kuidas mõjutab lühiajalise oksüdatiivse stressi rakendamine bL31 paraloogide koosseisu ribosoomis
2. Uurida, kuidas mõjutab ainult A või B paraloogi olemasolu ribosoomi koosseisus rakkude kasvufenotüüpi pideva stressi tingimustes.
3. Analüüsida A ja B tüve valgusünteesi täpsust in vivo

2. Materjal ja metoodika

2.1. Bakteritüved ja söötmed

Söötmed

2xYT (Yeast Extract Tryptone) – 1,6% trüpton, 0,5% NaCl, 1% pärmiekstrakt (Sambrook ja Russel, 2001)

LB (Luria broth) – 1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl, 1,7% agar (Bertani, 1951)

M9 – 1x M9 soolad (22 mM KH₂PO₄, 47,8 mM Na₂HPO₄, 18,7 mM NH₄Cl, 8,7 mM NaCl), 0,4% glükoos, 2 mM MgSO₄, 0,1 mM CaCl₂, 1 mg/ml tiamiin (Sambrook *et al.*, 2001)

M9 tardsööde – M9 soolad (22 mM KH₂PO₄, 47,8 mM Na₂HPO₄, 18,7 mM NH₄Cl, 8,7 mM NaCl), 0,4% glükoos, 2 mM MgSO₄, 0,1 mM CaCl₂, 0,1 µg/ml tiamiin 1,5% agar (Sambrook *et al.*, 2001)

MOPS sööde (modifitseeritud) – 1x MOPS soolad; 1,32 mM K₂HPO₄; 0,2% glükoos; 0,2 µg/ml tiamiin; [20x] 0,1 mg/ml aminohapped (Neidhardt *et al.*, 1974)

Tüved

Tabel 1. Kasutatud tüved

Bakteritüvi	Iseloomustus	Viide allikale
MG1655	<i>F- lambda- ilvG- rfb- 50 rph-1</i>	Blattner <i>et al.</i> , 1997
ΔbL31AB	MG1655Δ <i>rpmEΔykgM::kan</i>	Aivar Liiv
CRIM A	MG1655Δ <i>rpmEΔykgM::kan::rpmE</i>	Aivar Liiv
CRIM B	MG1655Δ <i>rpmEΔykgM :: kan :: ykgM</i>	Aivar Liiv
MG1655Δ <i>lacZ</i>	MG1655Δ <i>lacZΔlacI::kan</i>	Aivar Liiv
ΔbL31ABΔ <i>lacZ</i>	MG1655Δ <i>rpmEΔykgM ΔlacZΔlacI::kan</i>	Aivar Liiv

2.2. bL31 paraloogide koostise määramine oksüdatiivse ribosoomides stressitingimustes

Katse skeem:

1. Rakkude kasv eksponentsiaalse faasini
2. Stressi tekitava aine lisamine (parakvaat)
3. Kasvatame 2 pooldumist
4. Ribosoomide eraldamine
5. Massispektrita analüüs
6. L/H suhe arvutamine.

2.2.1. Parakvaadi töökonsentratsiooni määramine

Eesmärgiks oli leida optimaalne parakvaadi kontsentratsioon äkkilise stressi ajal, mis põhjustaks rakkude kasvu aeglustamist, kuid ei omaks bakteriostaatilist mõju. Rakud külvati 2ml MOPS söötmes ja kasvatati 12 h (180 rpm, 37°C). Üleööökultuuridest tehti lahjendus MOPS vedelsöötmesse nii, et kultuuri algtihedus $OD_{600}=0,08$ (lõpprumaalaga 20 ml) ning lisati parakvaat lõppkonsentratsiooniga – 0 mM, 1 mM, 5 mM ja 10 mM. Rakke kasvatati 37°C (180 rpm) ja rakukultuuri tihedust mõõdeti OD_{600} juures 30 min intervalliga.

2.2.2. Rakkude kasvatamine

MG1655 inokuleeriti 25 ml MOPS vedelsöötmesse ja kasvatati öö läbi loksutil (180 rpm 37°C, INFORS HT Multitron). Üleööökultuurides valmistati MOPS vedelsöötmes kolm proovi nimedega – „enne“, „kontroll“ ja „stress“. Proov „enne“ on vajalik, et uurida, mis toimub ribosoomi koostises tingimata enne stressi rakendamist. „Stressi“ proovi puhul tekitati parakvaadi kujul stressi (lõppkonsentratsioon 10 mM) $OD_{600} = 0,3$ juures ning rakudel lasti läbida kaks pooldumist ($OD_{600}=1$). Kontroll = rakud millele ei rakendatud stressi, kasvatati tiheduseni $OD_{600}=1$. Bakterikultuure kasvatati loksutil 37°C juures (180 rpm, INFORS HT Multitron).

2.2.3. Ribosoomide eraldamine

Rakud koguti tsentrifuugimisega (4500 rpm, 20 min, 4°C,), ja resuspendeeriti 1xOV-10 puhvris (OV-10: 20 mM Tris (pH=7,5), 100 mM NH_4Cl , 10 mM $MgOAc$, 6 mM β -

merkptoetanool;lõppruumala 800 µl. DOC (lõppkontsentratsioon 0,8%) ja Brij 58 (lõppkontsentratsioon 0,5%) lisamisega viidi ruumala 1 ml-ni. Lüsaat kanti 2 ml tuubidesse, kuhu oli lisatud 0,4 ml 0,1mm diameetriga klaaskuulikesi ning lisati lüsotsüüm (lõppkontsentratsioon 2 mg/ml) ja DNAasI (lõppkontsentratsioon 50 U/ml). Rakud lüüsi Precellys 24 (Bertin Technologies) homogenisaatoril 3x60s, 4°C. Lüsaat klaariti tsentrifuugides (13 000 rpm 20 min) ning mõõdeti OD260. 90 U klaaritud lüsaati (lõppruumalaga 700µl) kanti 10—25% sahharoosigradiendile ja ultrastentrifuugit õõ läbi ($\omega 2t = 2,7 \cdot 10^{11} \text{ rad}^2/\text{s}$, SW 28 rootor; 4°C; Beckman L90K ultrastentrifuug). Sahharoosi gradiendid fraktsioneeriti, koguti 70S ribosoomide fraktsioon. ning viidi ruumala viidi 20 ml-ni. 70S ribosoomid koguti ultrastentrifuugimisega ($\omega 2t = 1,2 \cdot 10^{12} \text{ rad}^2/\text{s}$, Ti50.2 rootor; 4°C; Beckman L90K ultrastentrifuug). Ribosoomide sade lahustati 200 mkl 1xOV-10 puhvris. ja hoiustati -80°C juures.

2.2.4. MS tulemuste analüüs

Massispektromeetria analüüsi jaoks kasutati standarditena 70S *medium-heavy* ribosoomide, mis olid eraldatud Kaspar Reieri poolt. bL31A ja bL31B kogus standardribosoomides oli eelnevalt määratud massispektromeetria abil. Uuritavad ribosoomid segati kokku standarditega molaarses suhtes 1:1, sadestati lisades TCA lõppekonsentratsiooniga 10%. Massispektromeetria analüüs teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogia instituudi proteoomika tuumiklabori poolt. MS/MS andmetest peptiidide identifitseerimiseks kasutati otsingumootorit Mascot. Otsingu parameetreid: identifitseeritava peptiidi m/z hälve - ± 7 ppm; peptiidi maksimaalne laeng - 2+; lubatud vahelejäätunud lõigete arv - 1, ensüüm - tripsiin; fikseeritud modifikatsioonid - karbamido-metüül (C); varieeruvad modifikatsioonid - oksüdeerumine (M), arginiin [^{13}C]₆, lüsiin [^2H]₄; MS/MS hälve - 0,02 Da. Otsing viidi läbi andmebaaside „UniprotKB *E.coli* MG1655 K-12“, mis sisaldas kõiki tüves leiduvate valkude järjestusi (alla laetud 22.01.2017, *contaminants*, mis sisaldas MS-is enimlevinud kontaminantide järjestusi, ning Mascoti sisest „Decoy“ andmebaasi. MS/MS andmete töötlemiseks kasutati vabavara programmi Skyline V.3.1.0.7316-s. MS/MS andmete töötlusel kasutati parameetreid: lubatud mitte-lõikamiste arv - 1; lubatud peptiidide pikkuste vahemik - 5—25 aminohapet. Töötlusel jäeti välja peptiidid, mis sisaldasid metioniini. Peptiidid, mis sisaldasid arginiini (C₆H₁₄N₄O₂) või lüsiini (C₆H₁₄N₄O₂) tähistati tähega L (inglise keelest: *light* - „kerge“). Peptiidid, mis sisaldasid arginiini ([^{13}C]₆H₁₄N₄O₂) või lüsiini (C₆H₁₀[^2H]₄N₂O₂), tähistati tähega H (inglise

keelest: *heavy* - „raske“). Andmetest saadud peptiidide intensiivsuste põhjal arvutati peptiidide L/H suhted. L/H suhe veapiirid esindati standardhälve kujul.

2.3. Kasvufenotüüpide analüüs

2.3.1. Optimaalne parakvaadi kontsentratsiooni leidmine pideva stressi katsetes

Üleöökuultuuridest tehti lahjendus M9 vedelsöötmesse nii, et kultuuri algtihedus $OD_{600}=0,0075$. Järgnvalt kanti 1 mikrotiitrimisplaadi kannu kohta 150 μ l lahjendust, millele lisati parakvaadi järgmiste lõppkontsentratsioonidega 0,14 mM, 0,1 mM, 0,07 mM, 0,05 mM, 0,35 mM, 0,025 mM, 0,0175 mM, 0,0125 mM. Paralleelselt kasvatati sama plaadil ilma parakavaadita kontrollproovid. Katse oli tehtud viies korduses. Rakke kasvatati 37°C juures mikrotiiterplaadilugejas (BMG POLARstar Omega), mis mõõtis iga 7 minuti järel bakterikultuuri optilist tihedust OD_{600} juures. Eesmärgiks oli leida optimaalne parakvaadi kontsentratsioon pideva stressi ajal, mis põhjustaks rakkude kasvu aeglustamist, kuid ei omaks bakteriostaatilist mõju.

2.3.2. Generatsiooniaja määramine

Üleöökuultuuridest tehti lahjendus M9 vedelsöötmesse nii, et kultuuri algtihedus $OD_{600}=0,0075$. Järgnvalt kanti 1 mikrotiitrimisplaadi kannu kohta 150 μ l lahjendust, millele lisati parakvaadi lõppkontsentratsioon 0,05 mM. Paralleelselt kasvatati sama plaadil ilma parakavaadita kontrollproovid. Rake kasvatati 35 h (37°C) ja 42 h (30°C) juures mikrotiiterplaadilugejas (BMG POLARstar Omega), mis mõõtis iga 7 minuti järel bakterikultuuri optilist tihedust OD_{600} juures. Generatsiooniaja määramisel lahutati mõõtmistulemusest foon (sööde ilma bakteriteta), OD_{600} näitajad logaritmiti alusel 2 ja saadud graafikute lineaarse osa tõusu (funktsioon *slope*) pöördväärtuse alusel arvutati pooldumisaeg minutites vastavalt valemile $(1/slope)*60$. Uuritavaid tüvesid analüüsti vähemalt viies sõltumatus korduses. Veapiirid esindati standardhälve kujul ja statistilise olulisuse määramiseks kasutati Studenti t-testi ($\alpha=0,05$)

2.3.3. Tilkkülv analüüs

Rakud kasvatati 2 ml M9 vedelsöötmes üleöö või 2 ml 2xYT kuni $OD_{600}=3$. Kultuuridest tehti vastavatesse söötmetesse lahjendusrida: 10^6 rakke/ml, $5*10^5$ rakke/ml, 10^5 rakke/ml, 10^4 rakke/ml, 2000 rakke/ml või 1000 rakke/ml rakku vastavavalt. Igast lahjendusest külvati 4,5 μ l (4500 rakku, 2250 rakku, 450 rakku, 45 rakku, 9 rakku ja 5 rakku vastavalt lahjendusreale)

taardsöötmele. Vatavalt eelkasvatamisele rakud külvati paralleelselt parakvaadiga (lõppkonsentratsioon 0,1mM) ja parakvaadita M9 või parakvaadiga (lõppkonsentratsioon 0,1mM) ja parakvaadita LB taardsöötmele. Rakke kasvatati temperatuuridel 42°C, 37°C, 30°C, 25°C ja 20°C . Katse oli tehtud kolmes korduses.

2.4. Translatsioonili täpsuse analüüs *in vivo*

2.4.1. Plasmiidid.

β -Galaktosidaasi aktiivsuse analüüsiks MG1655 Δ lacZ, CRIM A, CRIM B ja Δ bL31AB Δ lacZ tüved (tabel 1) kus puudusid lacZ ja lacI geenid, transformeeriti pSG seeria plasmiididega (tabel 2).

Tabel 2. Kasutatud plasmiidid

Plasmiidid	Iseloomustus	Viide allikale
pSG-25	Metsiktüve lacZ geeni ekspressioon, Tet ^R	(O'Connor ja Dahlberg, 1993)
pSG-12DP	Reporterplasmiid -1 raaminihke signaaliga N terminuses, Tet ^R	(O'Connor ja Dahlberg, 1993)
pSG-lac7	Reporterplasmiid +1 raaminihke signaaliga N terminuses, Tet ^R	(O'Connor ja Dahlberg, 1993)
pSG-3/4	Reporterplasmiid enneaegse UGA stop-koodoniga N terminuses, Tet ^R	(O'Connor ja Dahlberg, 1993)
pSG-163	Reporterplasmiid enneaegse UAG stop-koodoniga N terminuses, Tet ^R	(O'Connor ja Dahlberg, 1993)

pSG reporterplasmiidid (pACYC184 derivaadid; tetratsükliini resistentsus) on konstrueeritud M. O'Connori ja A. E. Dahlberi poolt (O'Connor ja Dahlberg, 1993). pSG-25 ekspresseerub metsiktüübi lacZ geeni. pSG-12DP ja pSG-lac7 omavad N-terminuses -1 ja +1 raaminihke signaali vastavalt. Nonsense mutatsioonidega pSG-3/4 UGA ja pSG-163 plasmiidid omavad N-terminuses UGA ja UAG enneaegset stop-koodonit vastavalt (O'Connor ja Dahlberg, 1993).

2.4.2. β -galaktosidaasi aktiivsuse mõõtmine translatsiooni täpsuse mõõtmiseks

Ülöökultuuridest tehti 75-kordne lahjendus MOPS vedelsöötmes, millele oli lisatud IPTG (lõppkonsentratsioon 1 mM). Rakud kasvatati kuni OD₆₀₀ = 0,5 37°C või 30°C juures.

Kultuurid lahjendati värskesse MOPS söötmesse algtiheduseni $OD_{600}=0,08$ ja kasvatati vastavalt eelkasvatamisele 37°C või 30°C juures kuni $OD_{600}=1$. Rakud inkubeeriti 10 min jää peal kasvu peatumiseks. Rakukultuurid jaotati laiali 200 μl kaupa 800 μl Z puhvrissi (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 50 mM β -merkaptotetanool). Sellest rakulahusest jaotati laiali 100 μl OD_{600} mõõtmiseks. Järgnevalt rakkudele lisati 50 μl kloroformi ja 20 μl 0,1% SDS. Proovid loksutati 15 min toatemperatuuril. Proovide temperatuuri viidi 30°C ja 100 μl supernatanrist kasutati järgnevas reaktsioonis. β -galoktosidaasi reaktsiooni alustamiseks, 20 μl o-nitrofenüül- β -D-galaktopüranosiidi [4 mg/ml orto-nitrofenüül- β -galaktosiid lahustatud fosfaatpuhvriss ($\text{pH}=7$)] lisati 100 μl proovidele, millele järgnes proovide 1h segamine 30°C juures. Reaktsioon oli peatatud 50 μl 1M Na_2CO_3 lisamisega ning OD_{420} mõõdeti spektrofotomeetri abil. OD_{420} oli normaliseeritud rakkude arvu vastu (OD_{600}). Katse oli tehtud kolmes korduses 37°C ja 30°C juures ja tulemuste keskmised olid normaliseeritud MG1655 vastu. Veapiirid esindati standard hälve kujul ja statistilise olulisuse määramiseks kasutati Studenti t-testi ($\alpha=0,05$).

3. Tulemused ja arutelu

3.1. Ribosoomide valguline koostis stressitingimustes

Ribosoom osaleb mitmetes protsessides, mis soosivad bakteriraku adapteerumist stressitingimustele (Starosta *et al.*, 2014). Näiteks HPF/RMF valkude vahendusel moodustub statsionaarses kasvufaasis 70S ribosoomidest 100S dimeer, mis viib ribosoomi „soikumisseisundisse“. Ebasoodsate tingimuste kadumisel dissotsieerub 100S dimeer aktiivseks 70S ribosoomiks. *In vitro* katsetega on näidatud nn „spetsialiseeritud ribosoomide“ olemasolu, milles puudub anti-Shine-Dalgarno (anti-SD) järjestust sisaldav heeliks 45 ning mis on võimeline siduma ja transleerima liiderjärjestuseta mRNA-d (Vesper *et al.*, 2011). Nii anti-Shine-Dalgarno järjestuse kui ka liiderjärjestuteta mRNA on tekitatud stressi tingimustel MazEF antitoksiin-toksiin poolt (Vesper *et al.*, 2011). Samasugune spetsiifilisus liiderjärjestuseta mRNA transleerimisel eksisteerib ka siis, kui 70S ribosoomi koostisest puudub valk bS1 (Moll *et al.*, 1998). Meie labori varasemad eksperimendid on näidanud, et statsionaarses kasvufaasis, kus lisaks toitainetevaegusele kuhjuvad ka oksüdatiivse stressi kahjustused, toimub B1b alamühikutevahelise silla komponendi bL31 paralooide vahetus bL31A vormist bL31B vastu (Lilleorg *et al.* käsikiri).

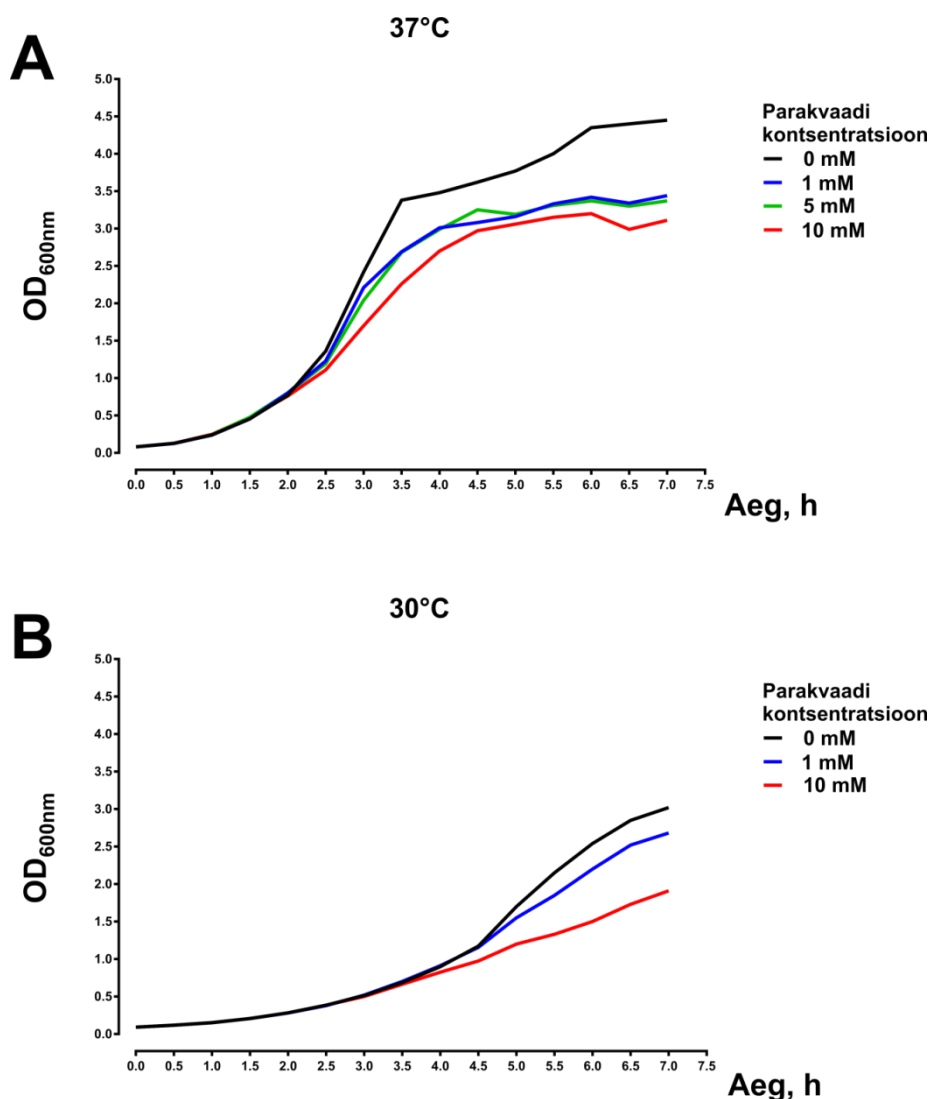
Olemasolevate katseandmete valguses tõstatas küsimus, kas erinevate paralooidega ribosoomid võivad samuti aidata rakkudel paremini adapteeruda stressitingimustega? Võttes arvesse seda, et bL31B osakaal ribosoomides tõuseb märkimisväärselt üleminekul statsionaarsesse kasvufaasi, on küsimus selles, kas bL31B-d sisaldavad ribosoomid võiksid olla stressi talumisel raku jaoks efektiivsemad.

Hindamaks L31 proloogide rolli rakkude kohastumisele stressitingimustega, analüüsisime A ja B paralooide sisaldust metsiktüüpi rakkude ribosoomides nii oksüdatiivse kui ka temperatuuristressi tingimustes.

Käesolevas uurimuses rakendati stressitingimuseks oksüdatiivset stressi. Üheks põhjuseks oli see, et bL31A paraloo sisaldab mitut tsüteiniinijääki, mille tiolrühmad on tundlikud oksüdeerimise suhtes, mille tulemusena võivad tekkida disulfiidsillad. Teiseks on oksüdatiivset stressi soodustavad tingimused iseloomulikud statsionaarsele kasvufaasile, kus ribosoomides on valdavalt bL31B (joonis 10). Oksüdatiivse stressi kunstlikuks esilekutsumiseks kasutati parakvaati e metüülviolageeni. Parakvaat, mida kasutatakse herbitsiidina, redutseeritakse kiiresti raku sees ja moodustub vaba radikaal. Vaba radikaal oksüdeeritakse aeroobsetes

tingimustes kiiresti molekulaarse hapniku poolt, mille tulemusena tekib superoksiidradikaal ($\bullet\text{O}_2^-$). Superoksiid radikaal on eellasmolekuliks reaktiivsetele hapnikuühenditele (ROS, *reactive oxygen species*), mis kahjustavad DNA-d, membraani lipiide, valke ja muid rakukomponente. Parakvaadi radikaali oksüdeerimise tulemusena taastub parakvaadi superoksiidi vorm ning see võib jätkata osalemist elektroni ülekandmisel. Selline olukord võimaldab keskkonnas püsivalt hoida oksüdatiivset stressi.

Selleks, et uurida, kas stressitingimused kutsuvad esile bL31A väljavahetumist ribosoomis bL31B vastu, rakendati rakukultuurile parakvaadi lisamisega äkilist ja lühiajalist oksüdatiivset stressi. Lühiajalise stressi katses kasvatati rakke minimaalsöötmes (MOPS) ilma parakvaadita kindla optimaalse tiheduseni ($\text{OD}_{600}=0,3$) ja siis tekitati parakvaadi lisamisega stress. Eelkatsetega selgitati välja optimaalne parakvaadi kontsentratsioon äkilise stressi jaoks – 10 mM (joonis 10). Katse eesmärgiks oli leida selline parakvaadi kontsentratsioon, mille mõju rakkude kasvule oleks mõõdukas, kuid mitte bakteriostaatiline. Selleks kasvatati MG1655 rakke MOPS minimaalsöötmes, kus parakvaadi lõppkontsentratsioon oli vastavalt 0 mM (kontroll), 1 mM, 5mM ja 10mM 37°C juures ning, 1 mM ja 10mM parakvaadi juuresolekul 30°C puhul. 30°C rakkude kasvatamise puhul jäeti välja 5 mM parakvaadi kontsentratsioon, kuna 37°C rakkude kasvatamisel selline kontsentratsioon näitas samu tulemusi kui 1 mM. Rakke kasvatati seitse tundi ja OD_{600} mõõdeti iga 30 minuti tagant.

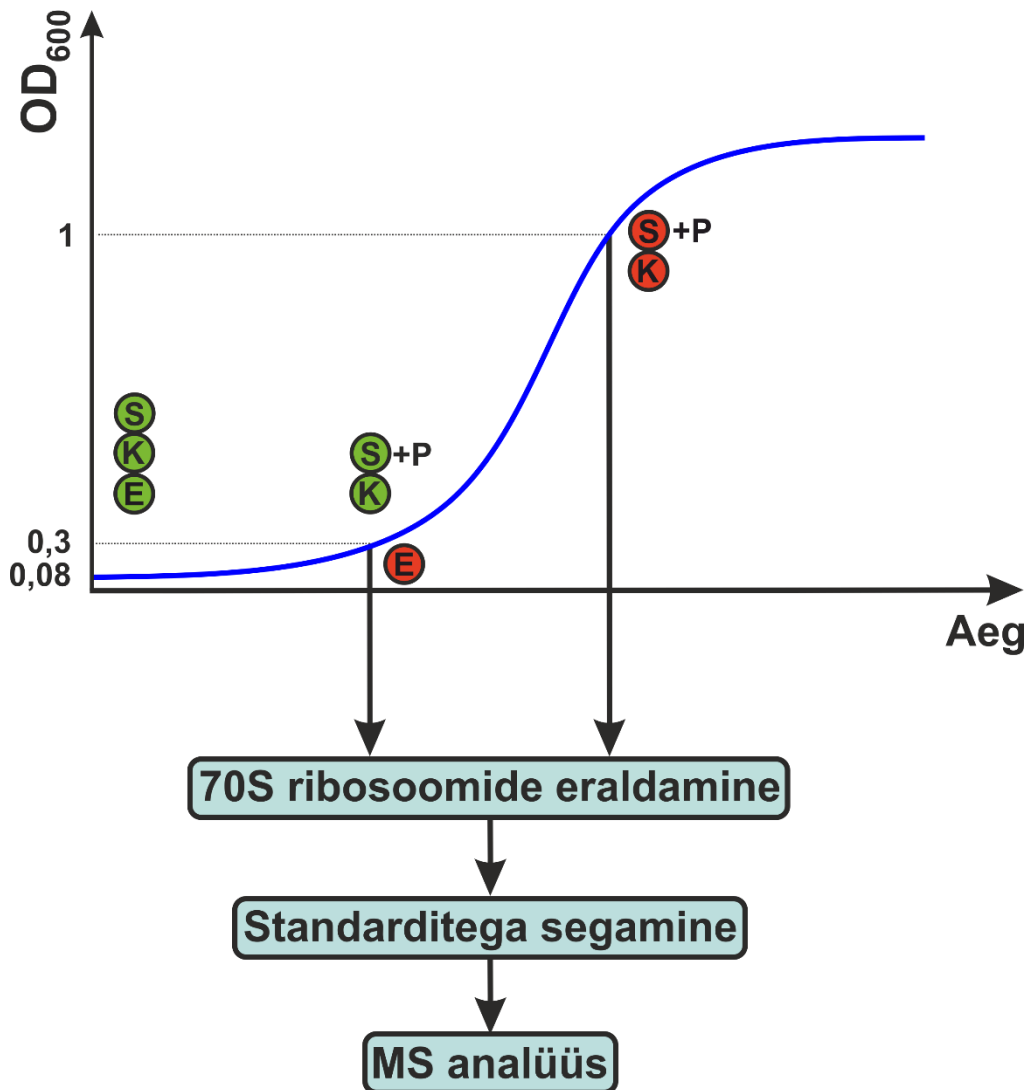


Joonis 10. Optimaalse parakvaadi töökonsentratsiooni määramine.

Üleöökultuuridest valmistati neli proovi ning tihedusel OD₆₀₀=0,5 lisati rakkudele parakvaat lõppkonsentratsiooniga 0 mM, 1 mM, 5 mM ja 10 mM. Rakke kasvatati 37°C ja (A) ja 30°C (B) juures, rakukultuuri tihedust mõõdeti A₆₀₀ juures 30 min intervalliga.

bL31 paraloogide sisalduse määramiseks ribosoomides kasvatati MOPS minimaalsöötmes 37°C juures paralleelselt kolm kultuuri: „enne“, „stress“ ja „kontroll“ (joonis 3). Proov „enne“ koguti rakkude tihedusel OD₆₀₀=0,3 ja see võimaldas vaadata ribosoomide valgulist koostist, sealhulgas bL31A ja bL31B paraloogide osakaalu varajases eksponentsiaalses faasis. „Stress“ proov kasvatati tiheduseni OD₆₀₀=0,3-ni, siis lisati parakvaat lõppkonsentratsiooniga 10 mM ja rakke kasvatati kuni eksponentsiaalse faasi keskele (OD₆₀₀=1). „kontrolli“ proov, kuhu ei lisatud parakvaati, koguti optilisel tihedusel OD₆₀₀=1 ja see peegeldab rakkude kasvunormaaltingimustes.

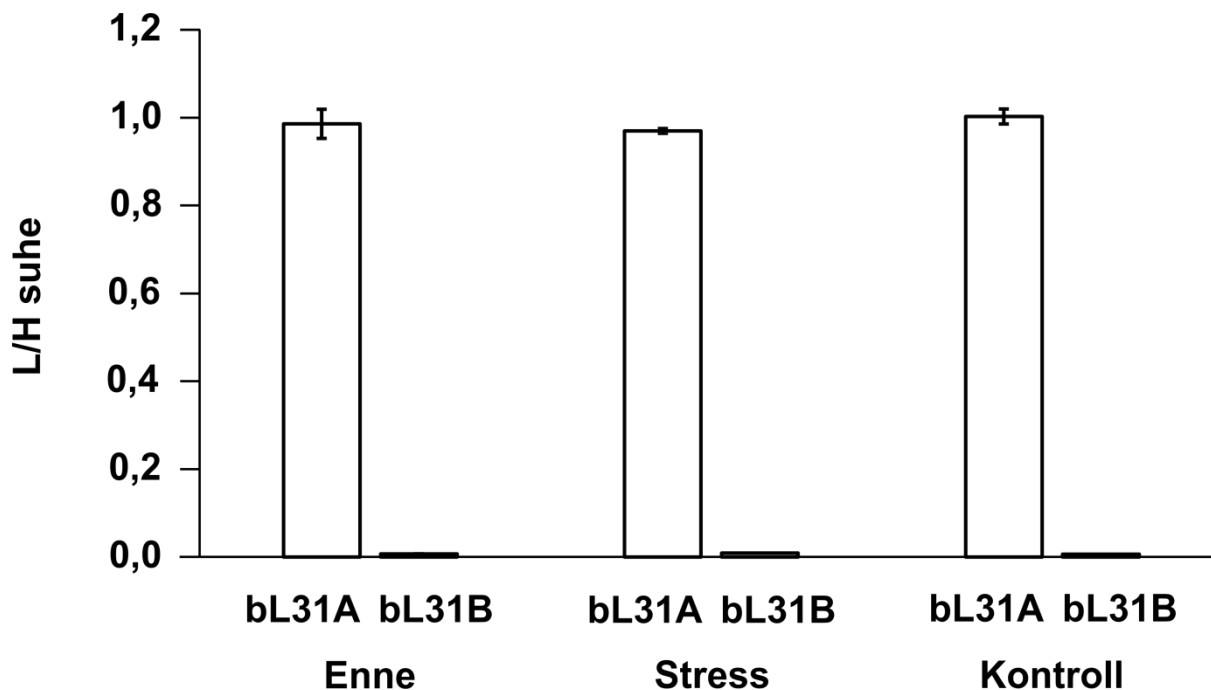
Selleks, et detekteerida bL31A või bL31B paraloogi osakaalu ribosoomides, kasutati massispektromeetria põhinevat analüüsimeetodit SILAC (*Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture*). SILAC on massispektromeetria põhinev analüüsi meetod, st selle aluseks on laenguga osakeste (ioonide) mass/laeng (m/z) väärtuse mõõtmine. Selleks, et kvantifitseerida valkude koostist, on vaja kasutada standardeid, mis kujutavad ennast mitte-radioaktiivsete ehk stabiilsete isotoopidega märgistatud valke. Käesoleva töö puhul kutsutakse standartiteks ribosoomide, mille koosseisu kuuluvad stabiilsete isotoopidega märgistatud r-valgud. Standard sisaldab stabiilsete isotoopidega märgistatud aminohappeid arginiini ($[^{13}\text{C}]_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$) ja lüsiini ($\text{C}_6[{}^2\text{H}]_4\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$). Neid standardproove kutsutakse ka „keskmisteks“, kuna nende aminohapete molekulmass on raskem kui looduses esinevast 6 Da võrra, ja märgistatakse H tähega (*heavy*). Bakteritüved, kellest eraldati standardribosoomid, on auksotroofsed arginiini ja lüsiini suhtes ning saavad omistada vastavaid aminohappeid ainult väliskeskkonnast (söötkest), mis tagab stabiilsete isotoopidega märgistatud aminohapete inkorporeerimise valkude koosseisu. Uuritav proov („kerge“, tähis L (*light*)) segati kokku standardiga ja analüüsiti vedelikkromatograafia-massispektromeetria (LC-MS ingl k. *liquid chromatography–mass spectrometry*) abil. MS analüüsist saadi peptiidide intensiivsused, millest arvutati peptiidide L/H suhted (proov/standard). L/H suhe võimaldab kvantifitseerida r-valkude, sealhulgas bL31A ja bL31B paraloogide kogust 70S ribosoomis. Katseskeem on kujutatud joonisel 11.



Joonis 11. Massispektromeetria katse skeem. Kolm proovi („stress“ – S, „kontroll“ – K, „enne“ – E,) kasvatati MOPS minimaalsöötmes 37°C algtiheduseni OD₆₀₀=0,08. Poov „enne“ kasvatati OD₆₀₀=0,3 ja samal optilisel tihedusel proovile „stress“ lisati 10 mM parakvaadi oksüdatiivse stressi tekitamiseks ning lasti edasi kasvatada paralleelselt koos prooviga „kontroll“ kuni OD₆₀₀=1. Rakud lüüsi ja neist eraldati 70S ribosoomid. Uuritavad ribosoomid segati 1:1 molaarses suhetes standarditega ja analüüsi neid LC-MS-ga, kust selgus bL31 paraloogide L/H suhe. Kasvavad rakukultuurid on märgistatud rohelisega, peatatud kasvuga rakukultuurid punasega. +P tähendab parakvaadi lisamist „stress“ proovile.

Eksponeentsiaalse kasvufaasi alguses ja keskepaigas sisaldavad metsiktüüpi ribosoomid valdavalt bL31A paraloogi (joonis 4), mis on kooskõlas meie labori varasemate tulemustega (Tammsalu, 2012; Lilleorg *et al* käsikiri). Samas, oksüdatiivse äkkstressi rakendamine parakvaadi

lisamisega ei põhjustanud 70S ribosoomides bL31A paraloogi osakaalu vähenemist ega bL31B paraloogi osakaalu suurenemist (joonis 12). Seega ei tuvastatud bL31A väljavahetust bL31B vastu kiire kasvu faasis.



Joonis 12. bL31 paraloogide kogus ribosoomides. 3 rakukultuuri („enne“, „stress“ ja „kontroll“) kasvatati 37°C juures MOPS söötmes. Proov „enne“ kasvas tingimata enne stressi lisamist ($OD_{600}=0,3$). Proovid „stress“ kasvas pärast stressi rakendamist ($OD_{600}=0,3$) stressitingimustel kaks pooldumist ($OD_{600}=1$). „Kontroll“ proov kasvas paralleelselt „stress“ prooviga ($OD_{600}=1$). Stressiproovile oli lisatud parakvaat (lõppkontsentratsiooniga 10mM), kui rakud jõudsid $OD_{600}=0,3$. Rakkudest eraldati ribosoomid ja segati need enne MS analüüsi standardribosoomidega. MS andmetest arvutati peptiidide L/H suhete keskmised ning keskmiste hajuvus on näidatud standardhälvetena.

Püstitatud hüpoteesi järgi bL31A paraloogi väljavahetus bL31B vastus annab eelist stressi talumises. Seda hüpoteesi toetasid need faktid, et bL31B asub valdavalt statsionaarses faasis ja bL31A väiksem sidumisvõime ribosoomiga võrreldes bL31B-ga (Akanuma *et al.*, 2006; Nanamiya *et al.*, 2004). bL31A paraloog omab neli tsüsteiini jääki, sealhulgas ka Zn^{2+} siduvat CxxC motiivi, ja tsüsteiinide kõrvalahelas olev tiolrühm tekitab tsüsteiinist tugeva nukleofiili (Ezraty *et al.*, 2017). Selle tulemusena tsüsteiini jäägid on tundlikud oksüdeerimisele, mille tagajärjel võivad tekkida ebakorrektsed disulfiidsillad (Ezraty *et al.*, 2017). Eksperimendis

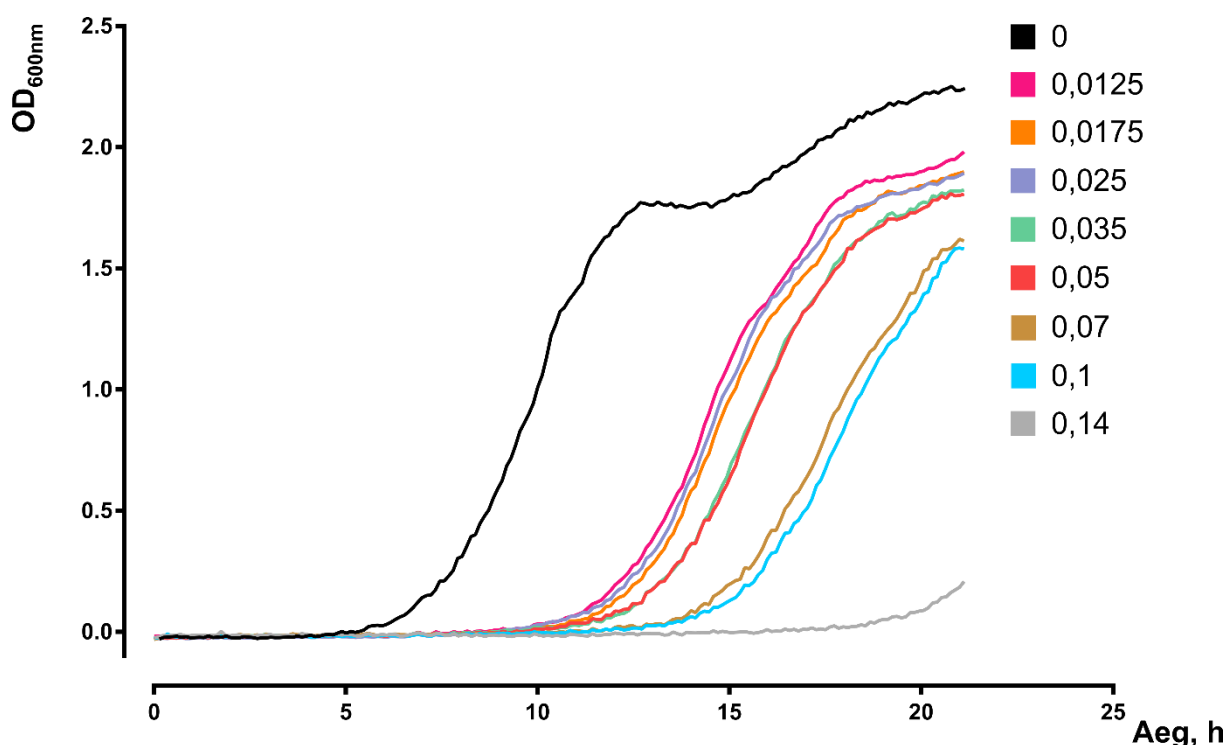
kasutatud stressitingimused ei põhjustavad bL31A paraloogi väljavahetust bL31B vastu (joonis 4). Võib arvata, et teistsugused katsetingimused (temperatuur, stressi mõju periood ja teistsugused oksüdatiivse stressi tekitajad, nt vesinikperoksiid või 4-nitrokinoliin-1-oksiid) võiksid omada suuremat efekti paraloogide koosseisule ribosoomis. bL31A valdav olemasolu 70S ribosoomi koosseisus viitab sellele, et valk püsib intaktsena vaatamata parakvaadi tekitatud lühiajalisele stressile. Eelpool püstitatud hüpotees ei leidnud veel kinnitust, aga vajab edaspidist uurimist.

3.2. bL31 r-vlagu paraloogide mõju rakukasvule stressitingimustes

Massispektromeetria analüüsi tulemused ei kinnitanud meie hüpoteesi, et äkiline stress võib muuta enneaegselt bL31A ja bL31B suhet ribosoomides B paraloogi suunas eksponentsiaalses kasvufaasis. On samas teada, et bL31 r-valgu puudumise pikendab generatsiooni- ehk pooldumisaja rikkas söötmes (2xYT) 37°C juures umbes 1,5 korda ja 30°C juures umbes 2,5 korda (Lilleorg *et al.*, 2017). Seoses sellega tekkis küsimus, kas paraloogide süsteemi olemasolu võib rakkudele anda eelise stressitalumisel. Selle küsimuse selgitamiseks mõõdeti MG1655, CRIM A, CRIM B ja ΔbL31AB tüvede generatsiooni ajad ja samuti analüüsiti rakkude kasvu tardsöötmeil tilk-külvmeetodil (*spot test*).

Käesolevas töös kasutati bakteritüvesid, mis ekspresseerisid kromosoomis konstitutiivselt kas bL31A või bL31B paraloogi. Selleks oli A. Liiv konstrueerinud CRIM plasmiidide süsteemi kasutades tüved, kus kromosoomis esines kas ainult bL31A või bL31B paraloogi geen (tähistatud vastavalt CRIM A ja CRIM B; CRIM *conditional-replication, integration, and modular*). Antud meetodika võimaldab viia kromosoomi meid huvitavaid geene, kasutades λ-bakterifaagi kohtspetsiifilisi integreerumisjärjestusi (viide). Tüvedest, kuhu integreeriti bL31A ja bL31B geenid, oli eelnevalt kõrvaldatud nii bL31A kui bL31B paraloogide geenid. Integreeritud geenid asuvad CRIM tüvedes konstitutiivse (*tac*) promootori all.

Paraloogide rolli selgitamiseks stressitingimustes rakendati pidevat oksüdatiivset stressi parakvaadi kujul ja mõõdeti pooldumisaegade. Pideva stressi katses kasvatati rakke minimaalsöötmes (M9), kus kasvu algusest peale oli tekitatud oksüdatiivse stressi tingimused. Eelkatsetega selgitati optimaalne parakvaadi kontsentratsioon pideva stressi jaoks – 0,05 mM (joonis 13). Katse eesmärgiks oli leida selline parakvaadi kontsentratsioon, mille mõju rakkude kasvule oleks mõõdukas, kuid mitte bakteriostaatiline. Selleks kasvatati MG1655 rakke M9 minimaalsöötmes, kus parakvaadi lõppkontsentratsioon oli vastavalt 0 mM (kontroll), 0,0125 mM, 0,0175 mM, 0,025 mM, 0,05 mM, 0,07 mM, 0,1 mM ja 0,14 mM 37°C juures. Rakke kasvatati 22 tundi ja mõõdeti OD₆₀₀ iga 7 minuti tagant.



Joonis 13. Optimaalse parakvaadi töökonsentratsiooni määramine.

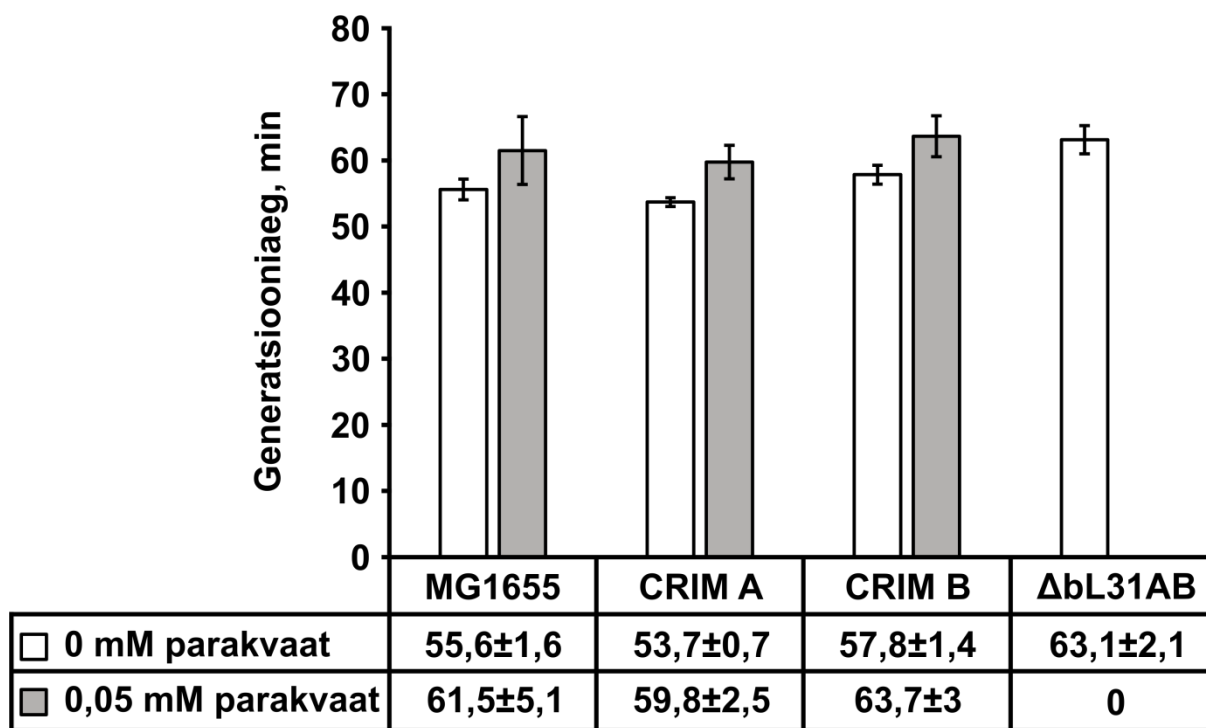
MG1655 kasvatati M9 söötmes (37°C), kus parakvaadi lõppkonsentratsioon oli vastavalt 0 mM (kontroll), 0,0125 mM, 0,0175 mM, 0,025 mM, 0,05 mM, 0,07 mM, 0,1 mM ja 0,14 mM 37°C juures. Joonisel on kujutatud erineva parakvaadi kontsentratsiooniga proovide kasvukõverate keskväärtused (n=4)

Generatsiooniaja määramiseks kasvatati MG1655, CRIM A, CRIM B ja Δ bL31AB tüvesid M9 minimaalsöötmes parakvaadi lisamisega (lõppkonsentratsioon 0,05 mM). Kasvufenotüüpide analüüsiks arvutati generatsiooniajad, mida defineeritakse kui ajavahemikku, mis kulub bakteriterakkude arvu kahekordistumiseks. Generatsiooniaeg arvutati poollogartimilises teljestikus oleva kasvukõvera lineaarse osa tõusu põhjal.

Meie katsetingimuste tulemusel on näha (joonis 14), et 37°C juures puudub pideva oksüdatiivse stressi mõju rakkude kasvule. CRIM A ja CRIM B tüvede vahel puudub sellistel tingimustel statistiliselt oluline erinevus pooldumisajal oksüdatiivse stressi olemasolul. Ilma oksüdatiivse stressita CRIM B generatsiooniaeg pikeneb marginaalselt.

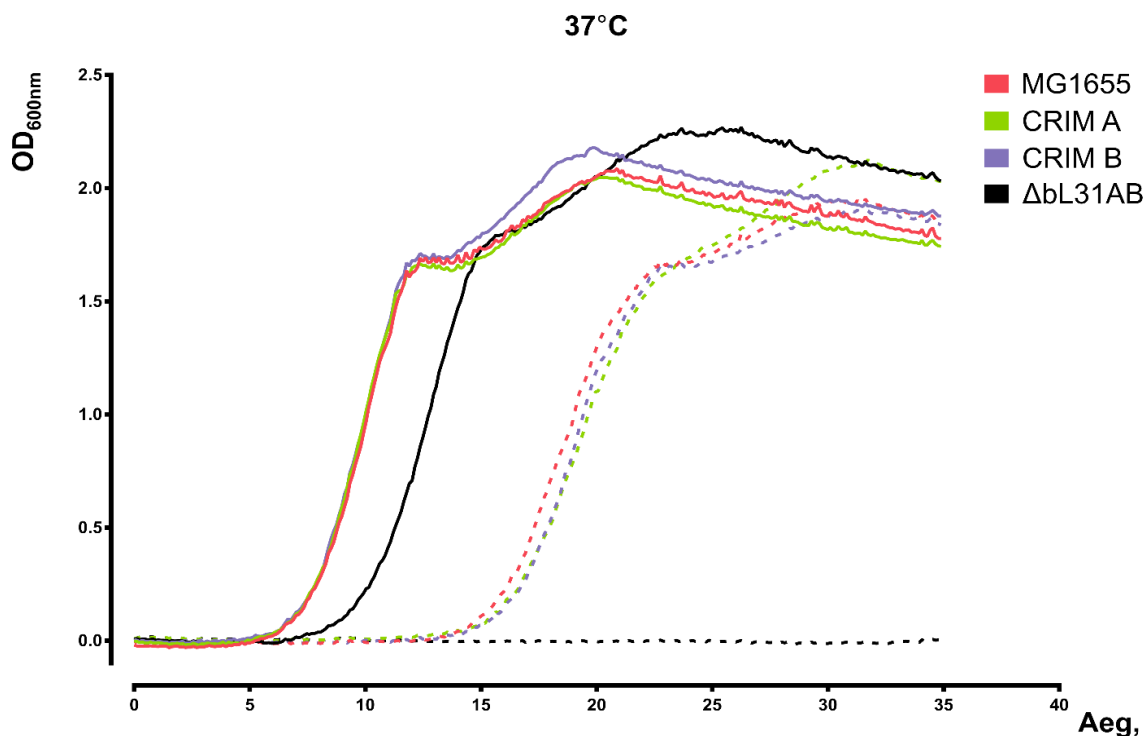
Samas bL31 r-valgul on olemas olulisus raku funktsioneerimiseks ja kasvuks. Mõlema paralooži puudumisel 37°C juures rakkude kasv on pikem umbes 10 min võrra pikkem kui

metsiktüvel (joonis 14). Topeltdeletanditüve kasvukiirus on võrreldatav metsiktüve ja ühe paraloogiga tüvede omaga oksüdatiivse stressi tingimustel. bL31 valgu füsioloogiline olulisus on nähtav oksüdatiivse stressi rakendamisel, mille tõttu rakud on võimetud kasvama.



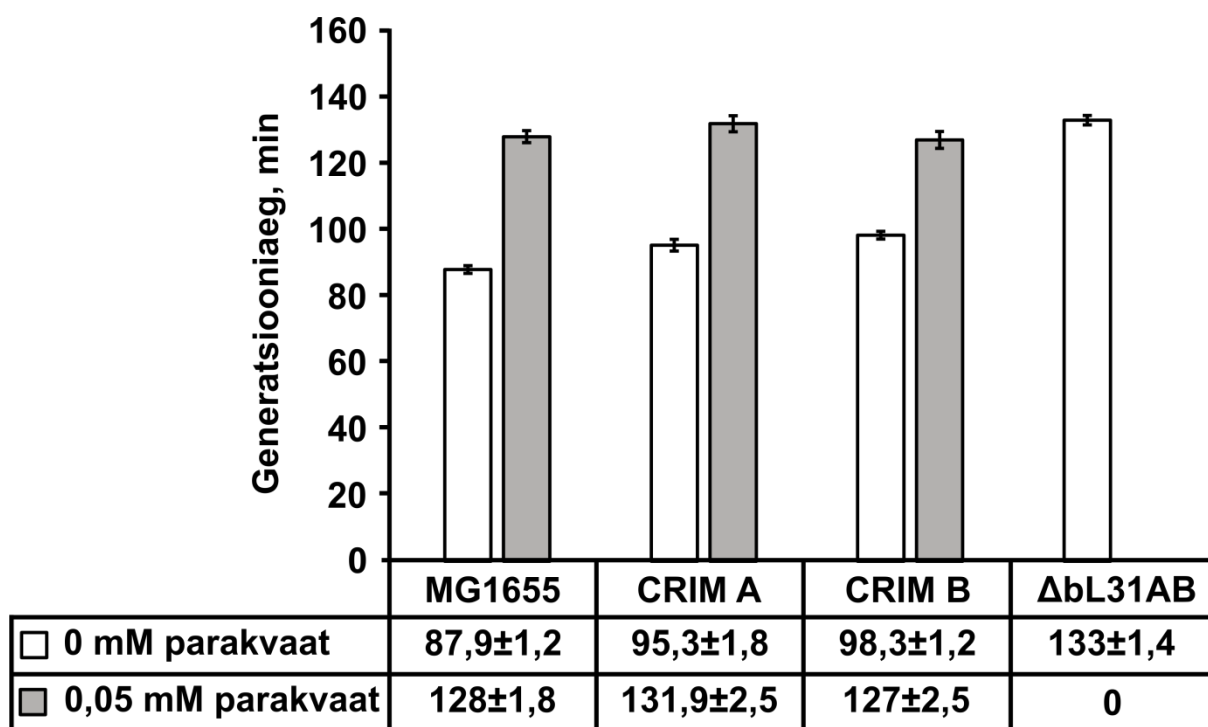
Joonis 14. MG1655, CRIM A, CRIM B ja ΔbL31AB tüvede generatsiooniajad stressi ja stressivaba keskkonnas, 37°C. Oksüdatiivse stressi rakendamine optimaalse temperatuuril omas marginaalset mõju generatsiooni ajale nii CRIM tüvedel kui metsiktüvel. (n=5±standardviga)

Huvitaval määral pideva oksüdatiivse stressis kasvatamine põhjustas lag faasi pikenemist (joonis 15). Normaalingimustel MG1655, CRIM A ja CRIM B rakud väljusid viie tunni pärast lag faasist, mis on kaks tundi varem kui ΔbL31AB tüvedel (7 h). Samas, stressitingimustel kasvatamine põhjustas metsiktüübil ja ühe paraloogiga tüvedel lag faas pikenemist kuni 10 tundi.



Joonis 15. MG1655, CRIM A, CRIM B ja ΔbL31AB tüvede kasvukõverad oksüdatiivse stressi keskkonnas ja ilma, 37°C. Oksüdatiivse stressi rakendamise põhjustas tüvedel lag faasi pikenemist 10 h võrra. Parallelselt kasvatati rakud ilma parakvaadi lisamisteta (pidevjoon) ja koos parakvaadiga (0,05 mM, punktiirjoon). Joonisel on kujutatud tüvede mõtmisandmete keskmised (n=4).

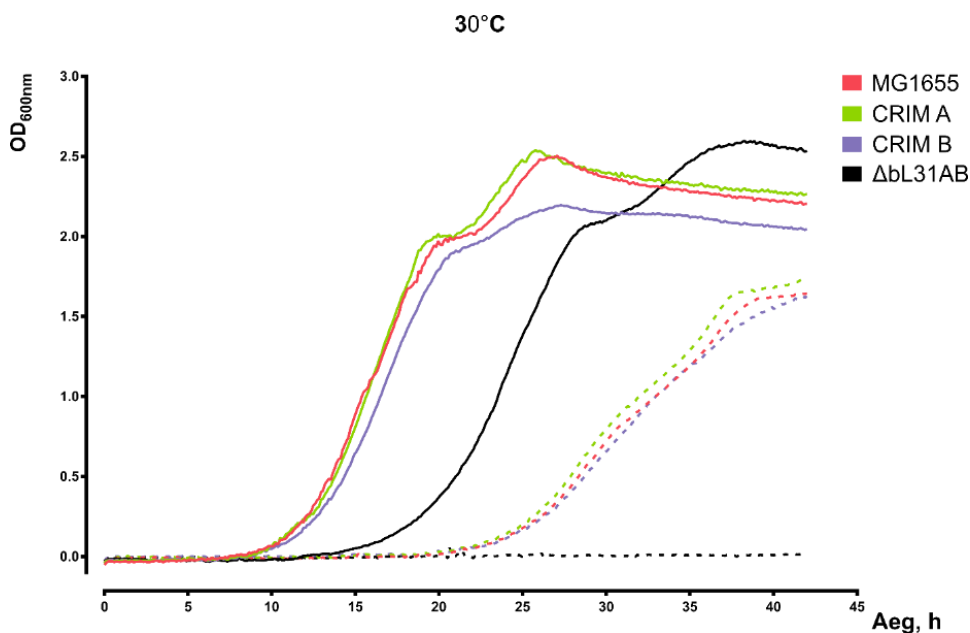
Järgnevalt vaadati sama oksüdatiivse stressi mõju madalamal (30°C) temperatuuril (joonis 16). Nagu võis arvata, kasvavad rakud 30°C juures 1,5 korda aeglasemalt kui 37°C. Samuti, oksüdatiivse stressi keskkond avaldab suuremat mõju rakkude kasvukiirusele, põhjustades nii metsiktüve kuid ka üksikvalguga mutantidel pooldumisaja pikenemist 1,5 korda. Kuigi bL31A ja bL31B paraloogide generatsiooniaeg on sarnane ilma stressi tingimustel, kasvavad nad mõnevõrra aeglasemalt kui metsiktüve rakud. Oksüdatiivse stressi tingimustel kõik kolme tüve omavad umbes sama kasvukiirust.



Joonis 16. MG1655, CRIM A, CRIM B ja ΔbL31AB tüvede generatsiooni ajad oksüdatiivse stressi ja stressivaba keskkonnas, 30°C. Oksüdatiivse stressi rakendamine suboptimaalse temperatuuril põhjustas generatsiooni aja pikenemist 1,5 korda nii CRIM tüvedel kui metsiktüvel. (n=5±standardviga)

Nagu 37°C puhul bL31 valkudeta rakud on võimetud kasvama stressi rakendamisel. bL31 valgu puudumine ribosoomist omab sama efekti pooldumisajale kui kasvatamine oksüdatiivse stressi tingimustel (joonis 8).

Samuti kui 37°C puhul pikeneb 30°C juures tunduvalt lag faas nii MG1655 metsiktüvel kui ka CRIM tüvedel (joonis 17). Nii CRIM tüved kui metsiktüüpitüvi väljusid stressita tingimustel samal ajal ehk 10 tundi pärast inokuleerimist, kuid topeltdeletatsioonitüvedel võttis viis tundi rohkem. Oksüdatiivse stress põhjustab lag faasi pikendamist 13 tunni võrra nii metsiktüvel kui ka CRIM tüvedel.

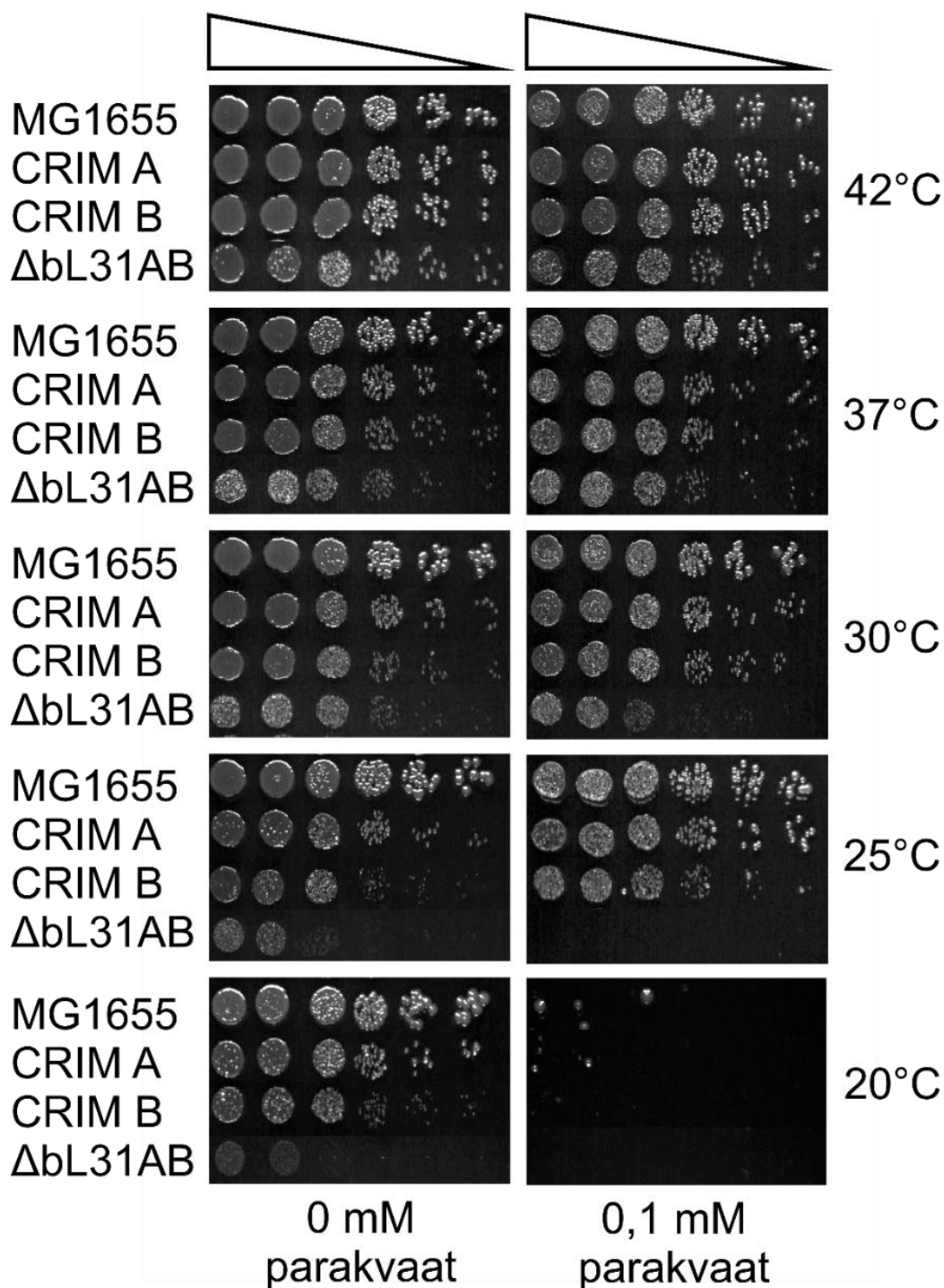


Joonis 17. MG1655, CRIM A, CRIM B ja Δ L31AB tüvede kasvukõverad oksüdatiivse stressi keskkonnas ja ilma, 30°C. Oksüdatiivse stressi rakendamise põhjustas tüvedel lag faasi pikenemist 13 h võrra. Parallelselt kasvatati rakud ilma parakvaadi lisamisteta (pidevjoon) ja koos parakvaadiga (0,05 mM, punktiirjoon). Joonisel on kujutatud tüvede mõtmisandmete keskmised ($n=4$).

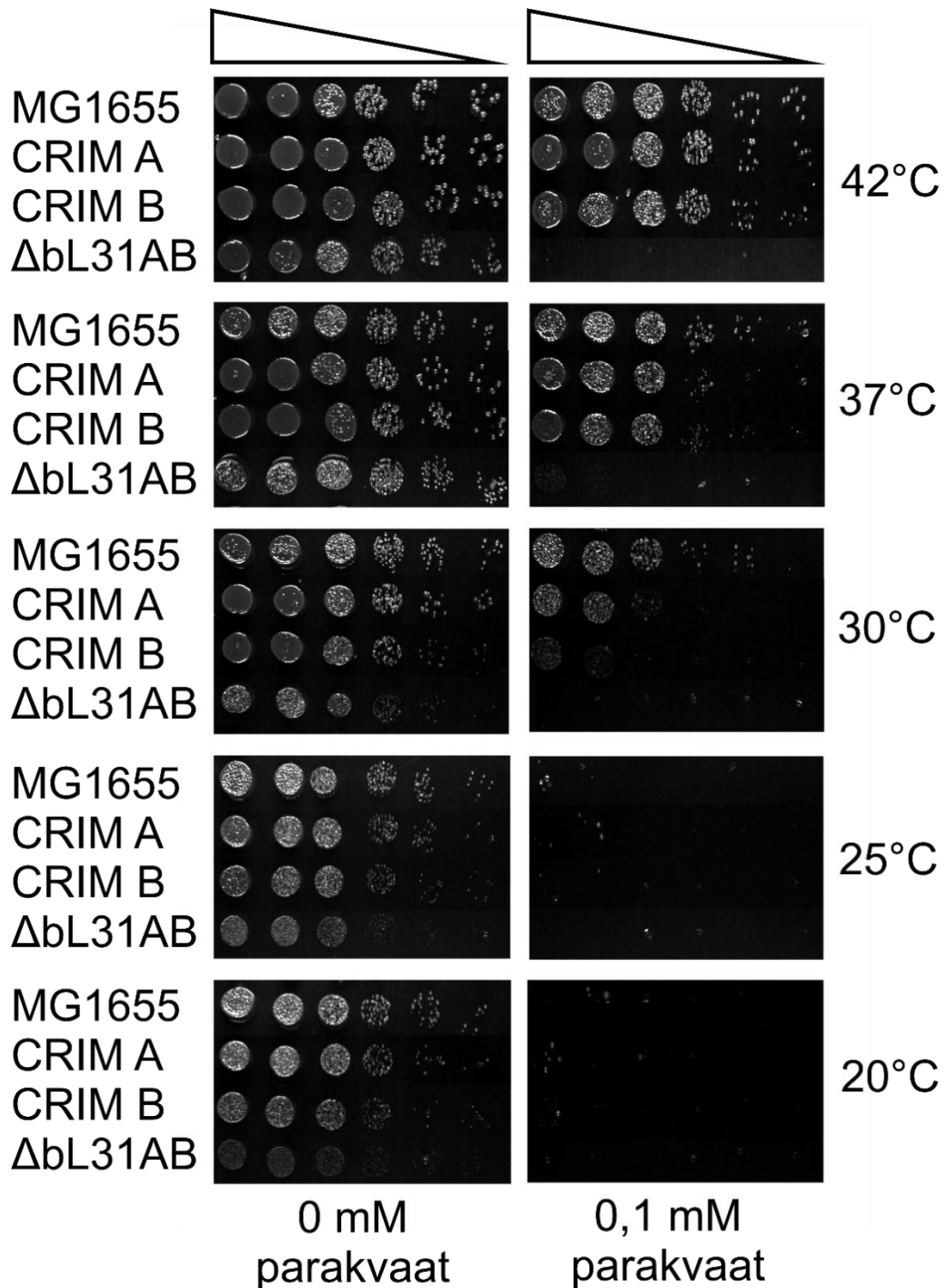
Generatsiooniaja katsete tulemuste kinnitamiseks viidi läbi tilk-külvanalüüsi (joonis 10 ja 11).. Rakud kasvatati nii rikkal (LB) kui minimaalsöötmel (M9), mis võimaldas jälgida ka olukorda, kui rakud peavad adapteeruma stressiga erineva toitainete kättesaadavustega keskkonnas.. Lisaks sellele, et rakud kasvatati viiel erineval temperatuuril (42°C, 37°C, 30°C, 25°C ja 20°C), kasvatati rakud samade temperatuuride juures paralleelselt ka oksüdatiivse stressi tekitavates tingimustes (parakvaadi lõppkontsentratsioon 0,1 mM).

CRIM A ja CRIM B kasvasid rikkal söötmel sarnaselt metsiktüve rakkudega ainult 42°C juures oksüdatiivse stressita tingimustel (joonis 18). Erinevused CRIM A ja CRIM B tüvede vahel hakkasid esinema 30°C-st, kus CRIM A tüvel esineb eelis kasvus suboptimaalsetel temperatuuridel. Ega CRIM A või CRIM B tüvi ei näita võrreldes teineteisega näilist eelist oksüdatiivse stressi tingimustel, mis on kooskõlas generatsiooni aja arvutamise katsetega. Kuid nende kasv on võrreldes metsikutüvega aeglasem. Δ L31AB tüvi näitab kasvudefekti võrreldes nii metsikutüvega kui ka CRIM A ja CRIM B tüvedega 37°C juures, kuid nõrk kasv on jälgitav

isegi 25°C. Samas oksüdatiivse stressi tingimustel Δ L31AB tekitab kasvudefekt 37°C ja rakkudel puudus kasv 25°C.



Joonis 18. MG1655, CRIM A, CRIM B ja Δ L31AB tüvede kasv oksüdatiivse ja temperatuuristressis (tilk-külv analüüs rikkal (LB) söötmel). Kolmnurgad näitavad vasakult paremale rakkude arvu ml, kõige suuremast (10^6) kuni kõige väiksema (1000). Vasakul on näidatud uuritud tüved: MG1655, CRIM A, CRIM B ja Δ L31AB. All on näidatud paraakvaadi kontsentratsioon tardsöötmes. Paremal on näidatud kasutatud temperatuurid. (n=3)



Joonis 19. MG1655, CRIM A, CRIM B ja dL31AB tüvede oksüdatiivse stressi ja temperatuuri vastu tilk-külv analüüs vaesel (M9) söötmel. Kolmnurgad näitavad vasakult paremale rakkude arvu ml, kõige suuremast (10^6) kuni kõige väiksema (1000). Vasakul on näidatud uuritud tüved: MG1655, CRIM A, CRIM B ja bL31AB. All on näidatud parakvaadi kontsentratsioon taardsöötmes. Paremal on näidatud kasutatud temperatuurid. (n=3)

Kui rakud olid sunnitud kasvama toitainetevaesemas keskkonnas, avaldus tüvede vahel rohkem erinevusi (joonis 19). CRIM B tüved demonstreerivad rohkem külmatundlikkuse fenotüüpi kui CRIM A tüvi alates 30°C. Võrreldes metsiktüvega näitavad CRIM tüved rohkem tundlikkust parakvaadi suhtes juba 37°C juures. Erinevused oksüdatiivse stressi tundlikkuses avalduvad paraloogide vahel 30°C juures, kus CRIM B kasv on aeglasem kui CRIM A tüvedel. Samas ühe paraloogi olemasolu on eluvajalik, et adapteeruda stressiga, kuna selle r-valgu mõlema paraloogi puudumine põhjustab tõsist kasvudefekti juba alates 30°C ja võimetust kasvada oksüdatiivse stressi tingimustel.

Genereatsiooniaja arvutamine ja tilk-külv analüüsi katsete eesmärk oli välja selgitada, kas bL31B paraloogil on olemas võrreldes bL31A paraloogidega eelis stressi talumises. Rakkudele rakendati nii temperatuuri- kui ka oksüdatiivset stressi, millest genereatsiooniaja arvutamisel selgusid marginaalsed erinevused bL31A ja bL31B tüvede vahel, kus esines bL31A-l kasvasid kiiremini. Tardsöötmel kasvatamisel avaldus rohkem erinevusi bL31A või bL31B r-valkudega ribosoomide rakkudel. Samuti mõlema CRIM tüve kasv võrreldes metsiktüvega oli kehvem.

Kasvukõverate analüüs ja sellest lähtuv pooldumisaja arvutamisel selgus, et oksüdatiivne stress määrisväärselt pikendab lag faasi. Lag faas esindab varajast perioodi rakukultuuri kasvus, kus rakud valmistuvad kiireks kasvuks eksponentsiaalses faasis (Rolfe *et al.*, 2012). Statsionaarse faasi ajal rakkudes kogunevad oksüdatiivsed vabad radikaalid, mis on võimelised kahjustama nii DNA-d kui ka valke (Nyström, 2003; Saint-Ruf *et al.*, 2007). Kuigi rakkudel on olemas oksüdatiivse stressi adapteerimise mehhanismid, on nad tihti allareguleeritud statsionaarses faasis, arvatavasti energia säilitamise jaoks (Saint-Ruf *et al.*, 2007). Kui statsionaarse faasi rakud sattuvad soodsatesse tingimustesse (nt värske sööde), kasutatakse seda perioodi oksüdatiivse stressi poolt tekitatud kahjustuste parandamine (Rolfe *et al.*, 2012). On leitud, et lag faasis on kõvasti ülesreguleeritud OxyR ja SoxS regulonid, mis osalevad vastavalt vesinikperoksiidi ja superoksiidi vastuses (Rolfe *et al.*, 2012). Lisaks sellele, lag faasis on suurenenud HslUV ja Lon proteaaside geenide ekspressioon, mis on soetud karbonüleeritud valkude lagundamisega (Rolfe *et al.*, 2012). Samas rakkudes on suurenenud tioredoksiini ja glutaredksiini ekspressiooni tase, mille roll on eemaldada ebatüüpilised disufiidsillad ja taastada valkudel õiget konformatsiooni (Rolfe *et al.*, 2012).

bL31 topeltdeletantide võimetus kasvada oksüdatiivse stressi tingimustel põhjuseks võib olla tüve ribosoomide vähenenud translatsiooniline täpsus (Lilleorg *et al.*, 2017), mille tõttu need

tüved on võimetud korrektselt sünteesima piisavalt oksüdatiivseid stressi valke. Selle tõttu nendel tüvedel võib puududa võime adapteeruda stressile. Samas valgul piisab bL31A või bL31B paraloogist, et kohaneda stressiga, mida näitab umbkaudu samaaegne väljumine lag faasist ja võrdsed generatsiooniajad.

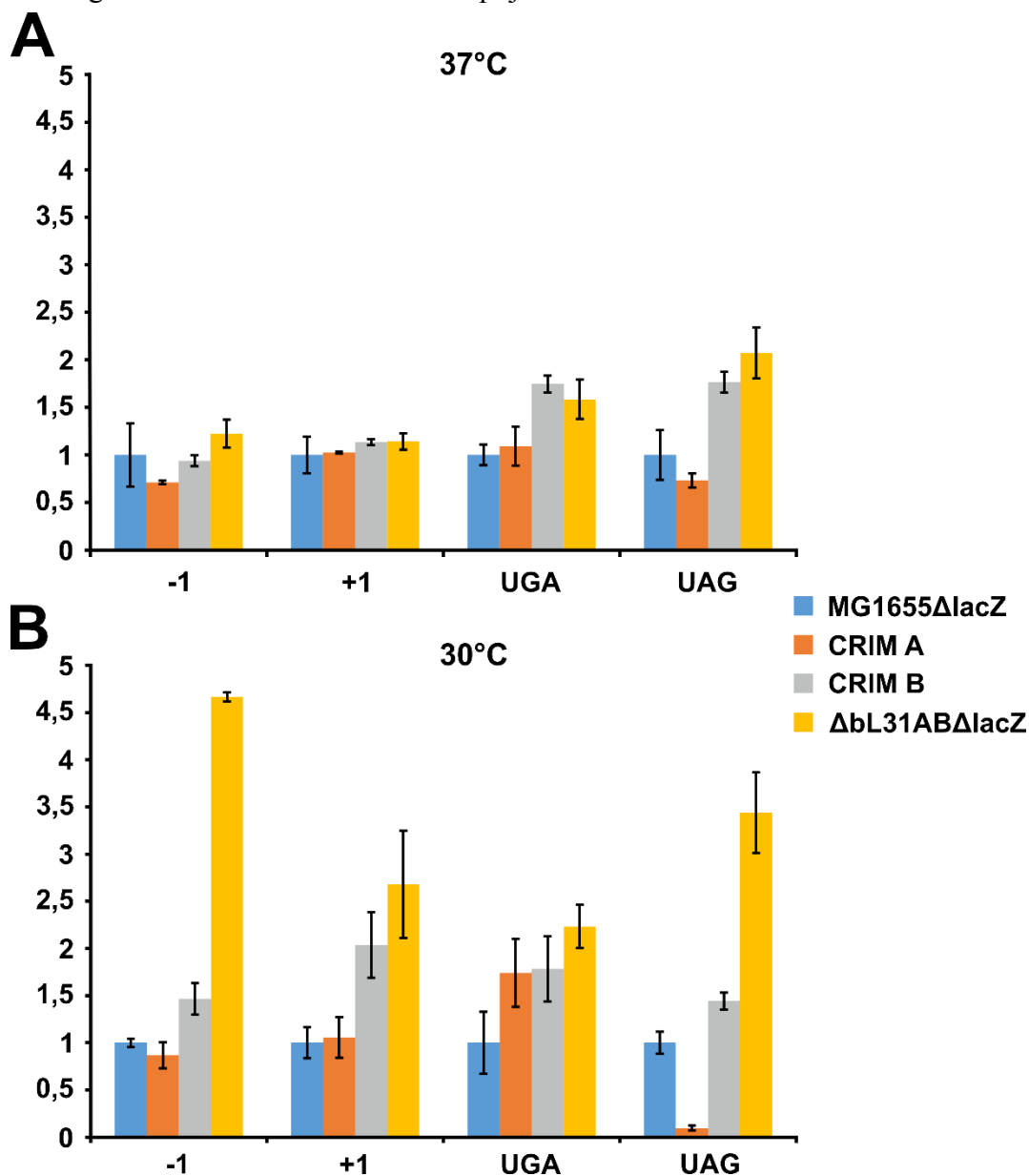
3.3. bL31 paraloogide mõju translatsiooni täpsusele stressitingimustes

Ribosomaalne valk bL31 on vajalik 30S alamühiku pea piirkonna ja 50S keskse kühmu vahelise B1b alamühikutevahelise silla komponent. B1b sild on oluline translokatsiooni protsesside jaoks (Jenner *et al.*, 2010). Translokatsiooni ajal pea piirkond läbib mitu konformatsioonilist muutust, mida on vaja translatsiooni edukaks kuluks (Jenner *et al.*, 2010). B1b silla struktuuri häirumine, kas bL31 või uS13 tõttu, suurendab ribosoomi poolt translatsiooniliste vigade tekkimist kuni 20 korda (Cukras ja Green, 2005; Lilleorg *et al.*, 2017). Selleks, et täpsemalt selgitada bL31 valgu paraloogide rolli translatsioonis, uuriti translatsioonilist täpsust, mida detekteeriti β -galaktosidaasi testi abil.

β -galaktosidaasi test põhineb lacZ markergeeni transleerimisel, mille sünteesi kaudu kinnitatakse ribosoomi funktsionaalsust. β -galaktosidaasi ensüüm on võimeline hüdrolüüsima 2-nitrofenüül- β -D-galaktopüranosiidi (ONPG) β -D-galaktoosiks ja o-nitrofenooliks. ONPG puhul on tegemist värvitu substraadiga, kuid o-nitrofenool kui saadus on kollane, mis lubab analüüsida β -galaktosidaasi ensümaatilist aktiivsust, mõõtes neelduvust lainepikkusel 420 nm. β -galaktosidaasi, mida kodeerib lacZ geen, ekspresseeritakse viielt plasmiidilt, kus üks kodeerib metsikut β -galaktosidaasi ja neli kas raaminihke või enneaegse stoppkoodoniga geenivarianti (M. O'Connor ja Dahlberg, 1993). Metsiktüve lacZ geen oli ekspresseeritud pSG-25 plasmiidilt ning +1 ja -1 raaminihked pSG-12DP ja pSG-lac7 vastavalt, UGA ja UAG nonsense mutatsioonid asuvad vastavalt pSG-3/4 ja pSG-163 plasmiididel. Plasmiidid on transformeeritud MG1655 Δ lacZ, CRIM A, CRIM B ja Δ L31AB Δ lacZ tüvedesse, kus puudub lacZ geen. lacZ ekspressioon raaminihe või nonsense mutatsiooniga plasmiidilt viitab ribosoomi ebatäpsele tööle.

CRIM A tüves on vähenenud -1 raaminihke sagedus võrreldes CRIM B tüve 25% võrra (joonis 20, paneel A). Lisaks sellele esines CRIM B tüve kõrgem UGA ja UAG stoppkoodoni läbilugemise sagedus võrreldes CRIM A tüvedega vastavalt 1,5 ja 2,5 korda. (joonis 20, paneel A). Samas +1 raaminihke sündmuste sagedus erineb bL31A ja bL31B r-valgu ribosoomidega rakkude vahel marginaalselt. Mõlema CRIM tüve translatsioonitäpsuse näitajad on samaväärsed MG1655 Δ lacZ metsikutüübi tulemustega võrreldes. Samas CRIM B tüvedel toimusid stoppkoodonite läbilugemised 1,75 korda rohkem nii UGA kui UAG puhul, kusjuures sagedus on sarnane Δ L31AB Δ lacZ tüve tulemustega. On huvitav, et võrreldes hiljuti avaldatud tööga (Silva *et al.*, 2017) käesolevatel katsetingimustel bL31 valgu puudumine ribosoomist

põhjustas märkimisväärsed erinevusi transleerimise täpsuses ainult UAG stoppkoodoni puhul. UGA stoppkoodoni puhul oli näidatud marginaalsed erinevused ja mõlema raaminihke toimumise sagedus oli samaväärne metsiktüüpi ja CRIM tüvede vahel.



Joonis 20. MG1655ΔlacZ, CRIM A, CRIM B ja ΔL31ABΔlacZ tüvede translatsioonitäpsuse mõõtmine β-galaktosidaasi testi abil. Y teljel on näidatud normaliseeritud väärtused vastava plasmidi MG1655ΔlacZ metsiktüve näitajatele. X teljel on näidatud missugust signaali detekteeriti pSG plasmiidilt: pSG-12DP (-1 raaminihe) ja pSG-lac7 (+1 raaminihe), pSG-3/4 (UGA nonsense mutatsioon) ja pSG-163 (UAG nonsense mutatsioon). normaliseeritud rakkude hulga suhtes. Tulemused on ja esitatud koos standardveaga. (n=3)

Kui katsetingimustes temperatuuri alandati suboptimaalseni (30°C), tekkis rohkem erinevusi translatsioonilisel täpsusel bL31 paraloogide tüvede vahel (joonis 20, paneel B). CRIM B tüvedel esines 1,7 korda rohkem -1 raaminihke sündmusi võrreldes CRIM A tüvega. UAG stoppkoodoni läbilugemist esines oli 15 korda tihedamini CRIM B tüvel võrreldes CRIM A omaga. Huvitaval määral CRIM A tüvede UAG stoppkoodoni läbilugemise sagedus oli 10,5 korda väiksem kui MG1655ΔlacZ tüvel. Samamoodi kui 37C esinesid +1 raaminihke sündmuse puhul marginaalsed erinevused bL31A ja bL31B paraloogidega ribosoomide vahel. Kuid võrreldes 37C puudus bL31 paraloogide vahel erinevus UGA stop-koodoni läbilugemise näitajates 30C puhul. CRIM B tüved näitasid ka 1,5 korda suuremat valetransleerimissündmuste arvu võrreldes MG1655ΔlacZ metsiktüve UAG stoppkoodoni läbilugemisega. bL31 valgu puudumisel esines ΔL31ABΔlacZ tüvel -1 ja +1 raaminihke sageduste suurenemist 4,5 ja 3,5 korda võrreldes MG1655ΔlacZ metsiktüvega.

Enamusel juhtudel bL31A paraloogiga tüvi näitas suuremat translatsioonilist täpsust kui bL31B paraloogiga tüvi. Selline nähtus leidis aset nii 37C kui ka 30C juures, kuid ainult +1 raaminihke lugemise sageduses esinesid marginaalne erinevus nii 37C kuid ka 30C puhul. 37C puhul CRIM A ja B tüve erinevused täpsuses olid tugevamad suboptimaalsel temperatuuril, mis on eriti näha -1 ja UAG koodoni puhul. Üldiselt bL31A r-valguga tüve näitajad olid rohkem võrreldavad metsiktüve omaga ja UAG stoppkoodoni puhul näitasid CRIM A tüve ribosoomid märkimisväärset täpsust. Vastupidi, bL31B tüvede translatsioonilise täpsuse näitajad olid sarnased ΔL31ABΔlacZ tulemustele. Samuti, bL31 valgu puudumisel ribosoomi koosseisust ei esinenud olulisi erinevusi 37C raaminihke näitajates. Kuid 30C puhul topeldeletatsiooni tüved näitasid suurt defekti translatsioonilises täpsuses nii raaminihke kui ka stoppkoodoni läbilugemise sageduses.

Rakkudel hoitakse translatsioonilist täpsust väga kõrgel tasemel ($10^{-4} - 10^{-3}$ viga *per* koodon) (Kramer *et al.*, 2010; Kurland, 1992; Ling *et al.*, 2009; Zaher ja Green, 2009). Translatsiooniline ebatäpsus on üldjuhul kahjustav ja letaalne nähtus rakkudeles (Drummond ja Wilke, 2009) Seda printsiipi kasutavad niisugused antibiootikumid nagu aminoglükosiidid. Aminoglükosiidi interaktsioonid 30S alamühiku dekodeeriva tsentriga suurendavad translatsioonil vea tekitamise sagedust ja valkude valet struktuuri formeerumist (Carter *et al.*, 2000; Fourmy *et al.*, 1996; J. M. Ogle *et al.*, 2001; Ogle *et al.*, 2002; Recht *et al.*, 1996). Samas, paljud uuringud on näidanud, et mõõdukal tasemel vigade tekitamine translatsiooni ajal võib soosida rakkudel adapteerumist stressitingimustele (Pan, 2013; Ribas de Pouplana *et al.*, 2014).

Vigane transleerimine tõstab DsrA ja sigma faktori RpoS (σ^{38}) taset rakus. DsrA kontrollib RpoS translatsiooni, mis omakorda on vajalik niisuguste oksüdatiivse stressi talumise valkude geenide aktivatsiooniks nagu katalaas (KatE) ja peroksidaas (OsmC) (Fan *et al.*, 2015).

Võib arvata, et bL31B paraloogi vähenenud translatsiooni täpsus on üks nendest mehhanismidest, mis kaitsevad rakke statsionaarses faasis, kus on kõrgendatud oksüdatiivse stressi tase. Kõrgendatud translatsioonilise ebatäpsuse mehhanismi aluseks võib olla potentsiaalne bL31B paraloogi poolt tekitatud teistsugune kontakt B1b sillal, mis võib võimaldada 30S peal teistsuguseid konformatsioone translokatsiooni ajal võrreldes bL31A-ga. Teiselt poolt bL31A valgu kõrgem translatsiooniline täpsus on oluline just eksponentsiaalses faasis, kus kiiresti kasvavad rakud peavad sünteesima suures hulgas valke ja tegema seda täpselt.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärk oli välja selgitada bL31 r-valgu bL31A ja bL31B paraloogide rolli ja võimalikke erinevusi rakukultuuride stressitingimustega adapteerumisel. bL31 paraloogide rolli selgitamiseks stressitingimustes uuriti ribosoomi valgulist koostist lühiajalises stressitingimustes massispektromeetria abil, kasvufenotüüpi pideva stressi ajal ja translatsiooni täpsust *in vivo*. Eelnevalt on teada, et eksponentsiaalses faasis asub valdavalt bL31A paraloog ribosoomi koosseisus, mida statsionaarses faasis vahetatakse bL31B vastu. Massispektromeetria analüüsist selgus, et lühiajaline oksüdatiivse stressi rakendamine ei põhjustanud bL31B valgu hulga suurendamist ribosoomide koosseisus.

Katsetest selgus, et pikaajalise stressi rakendamine vedelas minimaalsöötmes on bL31A ja bL31B tüved samaväärsed stressi talumises. Nii optimaalses kui ka suboptimaalsel temperatuuridel kasvatamisel pooldumisajad olid võrreldavad nii bL31A kui ka bL31B paraloogiga tüvedel. Parakvaadi lisamisel pikenes generatsiooni aeg 1,5 korda nii bL31A kui ka bL31B ja rakude lag faasi pikkus oli samasugune. Tilkkülv katsetest selgus bL31A paraloogi eelis kasvus suboptimaalsetel temperatuuridel kui ka oksüdatiivse stressi talumises. Selline nähtus oli detekteeritud nii minimaalsel kui ka rikkal söötmel.

bL31 r-valk on vajalik piiratud toitainete kättesaadavusega ja oksüdatiivse stressi tingimustel kasvuks. Nii generatsiooniaja mõõtmisel kui tilk-külvanalüüsist selgus, et ilma mõlema bL31 paraloogita rakud on võimetud kasvama niisugustes stressitingimustes. Selle tulemuse põhjuseks võib olla raku võimetus sünteesida piisavas hulgas stressitaluvuse valke lag faasis.

Translatsioonilise täpsuse mõõtmine näitas, et bL31A paraloog annab kõrgema translatsioonilise täpsuse ribosoomile kui bL31B paraloog. bL31A ja bL31B tüvede erinevused täpsuses olid tugevamad suboptimaalsel temperatuuril. Üldiselt bL31A r-valguga tüve näitajad olid samaväärsed metsiktüve omaga.

Kokkuvõtvalt võib öelda, et bL31 on vajalik rakkude normaalseks kasvuks ja stressi talumiseks. Kuigi bL31B on lülitatud ribosoomi koosseisu statsionaarses faasis, puudusid temal eelised bL31A tüve suhtes stressi talumises.

SUMMARY

On the importance of ribosomal protein bL31 paralogs in stress conditions

Ribosome is a large ribonucleoprotein complex responsible for protein synthesis in prokaryotes as well as in eukaryotes. In bacteria, ribosomes consist of r-proteins (“r” for ribosomal) and ribosomal RNA (rRNA) which makes up 2/3 of the ribosome itself. 70S ribosome comprises a large 50S subunit and a small 30S subunit. Ribosomes are considered to have a stable structure. However, the discovery of gene duplications (paralogs) of some prokaryotic r-proteins has caused the debate if paralogs are dynamically interchangeable depending on cells’ growth condition and therefore could cause heterogeneity of ribosome population.

Escherichia coli genome has duplications of two genes, that encode ribosomal proteins – bL31 and bL36. Paralogs are classified according to the presence or absence of zinc ion binding motif CxxC, paralogs are designated as A (CxxC+) or B (CxxC-). In exponential growth phase, bL31A is predominant in ribosomes. During growth of bacterial cultures when cells begin to enter stationary phase with its limited nutrition accessibility and higher oxidative environment, A paralogs are being exchanged for B in ribosomes. This gave rise to the hypothesis of why such phenomenon takes place, including the fact that, it may benefit cells in stress conditions. In the present study, we have concentrated our research on bL31 paralogs.

bL31 r-protein is a part of the B1b intersubunit bridge, which has exceptionally high dynamic properties. This property underlies in the composition of the bridge itself, as it is the only protein-protein bridge from twelve ribosomal bridges. Bridge integrity is necessary to allow head region of the 30S subunit to take correct conformational changes during translation. This in turn is needed to maintain high translational fidelity.

Because there is a shift from bL31A to bL31B in stationary phase, current research tried to find out, whether presence of bL31B will give benefits in tolerating stress conditions over cells with bL31A in their ribosomes. First, ribosomal protein composition with mass-spectrometry during sudden oxidative stress was assessed. Second, we analysed growth phenotypes in optimal and suboptimal temperatures and continuous oxidative stress. It was carried out by measuring generation time in liquid media and by observing growth on solid media by spot-test

analysis. Finally, we measured translational fidelity of *E. coli* strains expressing bL31A or bL31B paralog in optimal and suboptimal temperatures.

The results of this study can be summarised as follows:

1. Mass-spectrometry analysis have determined that sudden oxidative stress did not force cells to switch bL31A to bL31B in ribosomes.
2. Strains expressing either bL31A or bL31B paralog demonstrate equal results in tolerating continuous stress. Generation time of both strains was nearly identical during growth in optimal (37C) and suboptimal (30C) temperatures. Stress prolonged generation time by 1.5 fold in A and B alike.
3. Lag phase of both strains was prolonged two fold during prolonged stress conditions.
4. Spot-test analyses have demonstrated that bL31A containing strain grows better at suboptimal temperatures and tolerates more effectively oxidative stress than the bL31B expressing strain.
5. bL31 ribosomal protein is necessary for growing at suboptimal temperatures and tolerating oxidative stress in nutrient limiting conditions. Generation time measurements as well as spot tests have demonstrated that the absence of bL31 protein (both paralogs) leads to inability of cells to grow in oxidative stress conditions as well as at suboptimal temperatures in nutrient limiting media.
6. bL31A expressing strain exhibited higher translational fidelity than bL31B stain. The difference was more pronounced between strains containing either bL31A or B in translational fidelity. Overall bL31A strains demonstrated closer results to wild-type strains

Experimental results suggest that bL31 is needed for tolerating stress and for normal cell growth. This is supported by results where the absence of both bL31 paralogs resulted in inability of cells to grow in oxidative stress conditions and deficiencies in growing in suboptimal temperatures. Our experimental conditions show that the bL31A containing strain demonstrated higher stress adaptation fitness phenotypes and translational fidelity than the bL31B strain.

KASUTATUD KIRJANDUS

Agafonov, D. E., Kolb, V. A., & Spirin, A. S. (2001). Ribosome-associated protein that inhibits translation at the aminoacyl-tRNA binding stage. *EMBO Reports*, 2(5), 399–402. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve091>

Aiso, T., Yoshida, H., Wada, A., & Ohki, R. (2005). Modulation of mRNA stability participates in stationary-phase-specific expression of ribosome modulation factor. *Journal of Bacteriology*, 187(6), 1951–1958. <https://doi.org/10.1128/JB.187.6.1951-1958.2005>

Aizenman, E., Engelberg-Kulka, H., & Glaser, G. (1996). An Escherichia coli chromosomal „addiction module“ regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(12), 6059–6063.

Akanuma, G., Nanamiya, H., Natori, Y., Nomura, N., & Kawamura, F. (2006). Liberation of Zinc-Containing L31 (RpmE) from Ribosomes by Its Paralogous Gene Product, YtiA, in Bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology*, 188(7), 2715–2720. <https://doi.org/10.1128/JB.188.7.2715-2720.2006>

Amitai, S., Kolodkin-Gal, I., Hananya-Meltabashi, M., Sacher, A., & Engelberg-Kulka, H. (2009). Escherichia coli MazF leads to the simultaneous selective synthesis of both „death proteins“ and „survival proteins“. *PLoS Genetics*, 5(3), e1000390. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000390>

Arsène, F., Tomoyasu, T., & Bukau, B. (2000). The heat shock response of Escherichia coli. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1–3), 3–9.

Aseev, L. V., & Boni, I. V. (2011). Extraribosomal functions of bacterial ribosomal proteins. *Molecular Biology*, 45(5), 739. <https://doi.org/10.1134/S0026893311050025>

Atkinson, G. C., Tenson, T., & Hauryliuk, V. (2011). The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life. *PloS One*, 6(8), e23479. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023479>

Ban, N., Beckmann, R., Cate, J. H. D., Dinman, J. D., Dragon, F., Ellis, S. R., ... Yusupov, M. (2014). A new system for naming ribosomal proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 24, 165–169. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.01.002>

Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., & Steitz, T. A. (2000). The Complete Atomic Structure of the Large Ribosomal Subunit at 2.4 Å Resolution. *Science*, 289(5481), 905–920. <https://doi.org/10.1126/science.289.5481.905>

Ben-Shem, A., Loubresse, N. G. de, Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2011). The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 Å Resolution. *Science*, 334(6062), 1524–1529. <https://doi.org/10.1126/science.1212642>

Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 62(3), 293–300.

Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., ... Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5331), 1453–1462.

Brocklehurst, K. R., Hobman, J. L., Lawley, B., Blank, L., Marshall, S. J., Brown, N. L., & Morby, A. P. (1999). ZntR is a Zn(II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of zntA in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 31(3), 893–902.

Byrgazov, K., Manoharadas, S., Kaberdina, A. C., Vesper, O., & Moll, I. (2012). Direct interaction of the N-terminal domain of ribosomal protein S1 with protein S2 in *Escherichia coli*. *PloS One*, 7(3), e32702. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032702>

Carter, A. P., Clemons, W. M., Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T., & Ramakrishnan, V. (2000). Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*, 407(6802), 340–348. <https://doi.org/10.1038/35030019>

Chadani, Y., Niwa, T., Izumi, T., Sugata, N., Nagao, A., Suzuki, T., ... Taguchi, H. (2017). Intrinsic Ribosome Destabilization Underlies Translation and Provides an Organism with a Strategy of Environmental Sensing. *Molecular Cell*, 68(3), 528-539.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.020>

Christensen, S. K., Mikkelsen, M., Pedersen, K., & Gerdes, K. (2001). RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(25), 14328–14333. <https://doi.org/10.1073/pnas.251327898>

Christensen, Susanne K., & Gerdes, K. (2003). RelE toxins from bacteria and Archaea cleave mRNAs on translating ribosomes, which are rescued by tmRNA. *Molecular Microbiology*, 48(5), 1389–1400.

Contreras-Martinez, L. M., Boock, J. T., KostECKI, J. S., & DeLisa, M. P. (2012). The ribosomal exit tunnel as a target for optimizing protein expression in *Escherichia coli*. *Biotechnology Journal*, 7(3), 354–360. <https://doi.org/10.1002/biot.201100198>

Cukras, A. R., & Green, R. (2005). Multiple effects of S13 in modulating the strength of intersubunit interactions in the ribosome during translation. *Journal of Molecular Biology*, 349(1), 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.03.075>

Dallas, A., & Noller, H. F. (2001). Interaction of Translation Initiation Factor 3 with the 30S Ribosomal Subunit. *Molecular Cell*, 8(4), 855–864. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00356-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00356-2)

Davern, C. I., & Meselson, M. (1960). The molecular conservation of ribonucleic acid during bacterial growth. *Journal of Molecular Biology*, 2(3), 153-IN5. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(60\)80017-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(60)80017-4)

Dennis, P. P. (1974). In vivo stability, maturation and relative differential synthesis rates of individual ribosomal proteins in *Escherichia coli* B/r. *Journal of Molecular Biology*, 88(1), 25–41. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(74\)90293-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90293-9)

- Deusser, E. (1972). Heterogeneity of ribosomal populations in *Escherichia coli* cells grown in different media. *Molecular & General Genetics: MGG*, 119(3), 249–258.
- Deusser, E., & Wittmann, H. G. (1972). Ribosomal proteins: variation of the protein composition in *Escherichia coli* ribosomes as function of growth rate. *Nature*, 238(5362), 269–270.
- Di Pietro, F., Brandi, A., Dzeladini, N., Fabbretti, A., Carzaniga, T., Piersimoni, L., ... Giuliodori, A. M. (2013). Role of the ribosome-associated protein PY in the cold-shock response of *Escherichia coli*. *MicrobiologyOpen*, 2(2), 293–307. <https://doi.org/10.1002/mbo3.68>
- Diaconu, M., Kothe, U., Schlünzen, F., Fischer, N., Harms, J. M., Tonevitsky, A. G., ... Wahl, M. C. (2005). Structural Basis for the Function of the Ribosomal L7/12 Stalk in Factor Binding and GTPase Activation. *Cell*, 121(7), 991–1004. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.04.015>
- Drummond, D. A., & Wilke, C. O. (2009). The evolutionary consequences of erroneous protein synthesis. *Nature Reviews. Genetics*, 10(10), 715–724. <https://doi.org/10.1038/nrg2662>
- Eistetter, A. J., Butler, P. D., Traut, R. R., & Fanning, T. G. (s.a.). Characterization of *Escherichia coli* 50S ribosomal protein L3. *FEMS Microbiology Letters*, 5.
- Ezraty, B., Gennaris, A., Barras, F., & Collet, J.-F. (2017). Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nature Reviews. Microbiology*, 15(7), 385–396. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.26>
- Eymann, C., Homuth, G., Scharf, C., & Hecker, M. (2002). *Bacillus subtilis* functional genomics: global characterization of the stringent response by proteome and transcriptome analysis. *Journal of Bacteriology*, 184(9), 2500–2520.
- Fan, Y., Wu, J., Ung, M. H., De Lay, N., Cheng, C., & Ling, J. (2015). Protein mistranslation protects bacteria against oxidative stress. *Nucleic Acids Research*, 43(3), 1740–1748. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1404>
- Fischer, N., Neumann, P., Konevega, A. L., Bock, L. V., Ficner, R., Rodnina, M. V., & Stark, H. (2015). Structure of the *E. coli* ribosome–EF-Tu complex at $\sim 3\text{ \AA}$ resolution by C_s-corrected cryo-EM. *Nature*, 520(7548), 567–570. <https://doi.org/10.1038/nature14275>
- Fourmy, D., Recht, M. I., Blanchard, S. C., & Puglisi, J. D. (1996). Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5291), 1367–1371.
- Frank, J., Penczek, P., Grassucci, R., & Srivastava, S. (1991). Three-dimensional reconstruction of the 70S *Escherichia coli* ribosome in ice: the distribution of ribosomal RNA. *The Journal of Cell Biology*, 115(3), 597–605. <https://doi.org/10.1083/jcb.115.3.597>
- Frank, J., Verschoor, A., Li, Y., Zhu, J., Lata, R. K., Radermacher, M., ... Srivastava, S. (1995). A model of the translational apparatus based on a three-dimensional reconstruction of the *Escherichia coli* ribosome. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 73(11–12), 757–765.

- Gaballa, A., Wang, T., Ye, R. W., & Helmann, J. D. (2002). Functional analysis of the *Bacillus subtilis* Zur regulon. *Journal of Bacteriology*, 184(23), 6508–6514.
- Galvani, C., Terry, J., & Ishiguro, E. E. (2001). Purification of the RelB and RelE proteins of *Escherichia coli*: RelE binds to RelB and to ribosomes. *Journal of Bacteriology*, 183(8), 2700–2703. <https://doi.org/10.1128/JB.183.8.2700-2703.2001>
- Gao, H., Sengupta, J., Valle, M., Korostelev, A., Eswar, N., Stagg, S. M., ... Frank, J. (2003). Study of the Structural Dynamics of the *E. coli* 70S Ribosome Using Real-Space Refinement. *Cell*, 113(6), 789–801. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00427-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00427-6)
- Gao, N., Zavialov, A. V., Li, W., Sengupta, J., Valle, M., Gursky, R. P., ... & Frank, J. (2005). Mechanism for the disassembly of the posttermination complex inferred from cryo-EM studies. *Molecular cell*, 18(6), 663-674.
- Gentry, D. R., Hernandez, V. J., Nguyen, L. H., Jensen, D. B., & Cashel, M. (1993). Synthesis of the stationary-phase sigma factor sigma s is positively regulated by ppGpp. *Journal of Bacteriology*, 175(24), 7982–7989.
- Gerdes, K., Christensen, S. K., & Løbner-Olesen, A. (2005). Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(5), 371–382. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1147>
- Germain, E., Roghanian, M., Gerdes, K., & Maisonneuve, E. (2015). Stochastic induction of persister cells by HipA through (p)ppGpp-mediated activation of mRNA endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(16), 5171–5176. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423536112>
- Giuliodori, A. M., Gualerzi, C. O., Soto, S., Vila, J., & Tavío, M. M. (2007). Review on bacterial stress topics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1113, 95–104. <https://doi.org/10.1196/annals.1391.008>
- Gongadze, G. M. (2011). 5S rRNA and ribosome. *Biochemistry (Moscow)*, 76(13), 1450–1464. <https://doi.org/10.1134/S0006297911130062>
- Grajevskaja, R. A., Ivanov, Y. V., & Saminsky, E. M. (1982). 70-S ribosomes of *Escherichia coli* have an additional site for deacylated tRNA binding. *European Journal of Biochemistry*, 128(1), 47–52.
- Gulen, B., Petrov, A. S., Okafor, C. D., Vander Wood, D., O'Neill, E. B., Hud, N. V., & Williams, L. D. (2016). Ribosomal small subunit domains radiate from a central core. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep20885>
- Hazan, R., Sat, B., & Engelberg-Kulka, H. (2004). *Escherichia coli* mazEF-mediated cell death is triggered by various stressful conditions. *Journal of Bacteriology*, 186(11), 3663–3669. <https://doi.org/10.1128/JB.186.11.3663-3669.2004>
- Helgstrand, M., Mandava, C. S., Mulder, F. A. A., Liljas, A., Sanyal, S., & Akke, M. (2007). The Ribosomal Stalk Binds to Translation Factors IF2, EF-Tu, EF-G and RF3 via a Conserved Region of the L12 C-terminal Domain. *Journal of Molecular Biology*, 365(2), 468–479. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.025>

- Hemm, M. R., Paul, B. J., Miranda-Ríos, J., Zhang, A., Soltanzad, N., & Storz, G. (2010). Small stress response proteins in *Escherichia coli*: proteins missed by classical proteomic studies. *Journal of Bacteriology*, 192(1), 46–58. <https://doi.org/10.1128/JB.00872-09>
- Hensley, M. P., Gunasekera, T. S., Easton, J. A., Sigdel, T. K., Sugarbaker, S. A., Klingbeil, L., ... Crowder, M. W. (2012). Characterization of Zn(II)-responsive ribosomal proteins YkgM and L31 in *E. coli*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 111, 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.11.022>
- Ikegami, A., Nishiyama, K., Matsuyama, S., & Tokuda, H. (2005). Disruption of rpmJ encoding ribosomal protein L36 decreases the expression of secY upstream of the spc operon and inhibits protein translocation in *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(8), 1595–1602. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.1595>
- Izutsu, K., Wada, A., & Wada, C. (2001). Expression of ribosome modulation factor (RMF) in *Escherichia coli* requires ppGpp. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 6(8), 665–676.
- Jenner, L., Demeshkina, N., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2010). Structural rearrangements of the ribosome at the tRNA proofreading step. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(9), 1072–1078. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1880>
- Jiang, L., Schaffitzel, C., Bingel-Erlenmeyer, R., Ban, N., Korber, P., Koning, R. I., ... Abrahams, J. P. (2009). Recycling of aborted ribosomal 50S subunit-nascent chain-tRNA complexes by the heat shock protein Hsp15. *Journal of Molecular Biology*, 386(5), 1357–1367. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.079>
- Kaczanowska, M., & Rydén-Aulin, M. (2007). Ribosome Biogenesis and the Translation Process in *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 71(3), 477–494. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-07>
- Kato, T., Yoshida, H., Miyata, T., Maki, Y., Wada, A., & Namba, K. (2010). Structure of the 100S ribosome in the hibernation stage revealed by electron cryomicroscopy. *Structure (London, England: 1993)*, 18(6), 719–724. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.02.017>
- Klauck, E., Typas, A., & Hengge, R. (2007). The sigmaS subunit of RNA polymerase as a signal integrator and network master regulator in the general stress response in *Escherichia coli*. *Science Progress*, 90(Pt 2-3), 103–127.
- Korber, P., Stahl, J. M., Nierhaus, K. H., & Bardwell, J. C. (2000). Hsp15: a ribosome-associated heat shock protein. *The EMBO Journal*, 19(4), 741–748. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.4.741>
- Kramer, E. B., Vallabhaneni, H., Mayer, L. M., & Farabaugh, P. J. (2010). A comprehensive analysis of translational missense errors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA (New York, N.Y.)*, 16(9), 1797–1808. <https://doi.org/10.1261/rna.2201210>
- Kurland, C. G. (1992). Translational accuracy and the fitness of bacteria. *Annual Review of Genetics*, 26, 29–50. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.26.120192.000333>

- Li, G.-Y., Zhang, Y., Inouye, M., & Ikura, M. (2009). Inhibitory mechanism of Escherichia coli RelE-RelB toxin-antitoxin module involves a helix displacement near an mRNA interferase active site. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(21), 14628–14636. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809656200>
- Lilleorg, S., Reier, K., Remme, J., & Liiv, A. (2017). The Intersubunit Bridge B1b of the Bacterial Ribosome Facilitates Initiation of Protein Synthesis and Maintenance of Translational Fidelity. *Journal of Molecular Biology*, 429(7), 1067–1080. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.02.015>
- Lim, J., Lee, K.-M., Kim, S. H., Kim, Y., Kim, S.-H., Park, W., & Park, S. (2011). YkgM and ZinT proteins are required for maintaining intracellular zinc concentration and producing curli in enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) O157:H7 under zinc deficient conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 149(2), 159–170. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.017>
- Ling, J., Reynolds, N., & Ibba, M. (2009). Aminoacyl-tRNA synthesis and translational quality control. *Annual Review of Microbiology*, 63, 61–78. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073210>
- Liu, Q., & Fredrick, K. (2016). Intersubunit Bridges of the Bacterial Ribosome. *Journal of Molecular Biology*, 428(10 Pt B), 2146–2164. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.02.009>
- Makarova, K. S., Ponomarev, V. A., & Koonin, E. V. (2001). Two C or not two C: recurrent disruption of Zn-ribbons, gene duplication, lineage-specific gene loss, and horizontal gene transfer in evolution of bacterial ribosomal proteins. *Genome Biology*, 2(9), RESEARCH 0033.
- Maki, Y., Yoshida, H., & Wada, A. (2000). Two proteins, YfiA and YhbH, associated with resting ribosomes in stationary phase Escherichia coli. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 5(12), 965–974.
- Mattheakis, L. C., & Nomura, M. (1988). Feedback regulation of the spc operon in Escherichia coli: translational coupling and mRNA processing. *Journal of Bacteriology*, 170(10), 4484–4492. <https://doi.org/10.1128/jb.170.10.4484-4492.1988>
- Milne, A. N., Mak, W. W., & Wong, J. T. (1975). Variation of ribosomal proteins with bacterial growth rate. *Journal of Bacteriology*, 122(1), 89–92.
- Moll, I., Huber, M., Grill, S., Sairafi, P., Mueller, F., Brimacombe, R., ... Bläsi, U. (2001). Evidence against an Interaction between the mRNA downstream box and 16S rRNA in translation initiation. *Journal of Bacteriology*, 183(11), 3499–3505. <https://doi.org/10.1128/JB.183.11.3499-3505.2001>
- Moll, I., Resch, A., & Bläsi, U. (1998). Discrimination of 5'-terminal start codons by translation initiation factor 3 is mediated by ribosomal protein S1. *FEBS Letters*, 436(2), 213–217.
- Moll, Isabella, & Engelberg-Kulka, H. (2012). Selective translation during stress in Escherichia coli. *Trends in biochemical sciences*, 37(11), 493–498. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.07.007>

- Moll, Isabella, Grill, S., Gründling, A., & Bläsi, U. (2002). Effects of ribosomal proteins S1, S2 and the DeaD/CsdA DEAD-box helicase on translation of leaderless and canonical mRNAs in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 44(5), 1387–1396.
- Moll, Isabella, Hirokawa, G., Kiel, M. C., Kaji, A., & Bläsi, U. (2004). Translation initiation with 70S ribosomes: an alternative pathway for leaderless mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 32(11), 3354–3363. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh663>
- Moore, P. B., & Steitz, T. A. (2003). After the ribosome structures: How does peptidyl transferase work? *RNA*, 9(2), 155–159. <https://doi.org/10.1261/rna.2127103>
- Nanamiya, H., Akanuma, G., Natori, Y., Murayama, R., Kosono, S., Kudo, T., ... Kawamura, F. (2004). Zinc is a key factor in controlling alternation of two types of L31 protein in the *Bacillus subtilis* ribosome. *Molecular Microbiology*, 52(1), 273–283. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2003.03972.x>
- Neidhardt, F. C., Bloch, P. L., & Smith, D. F. (1974). Culture Medium for Enterobacteria. *Journal of Bacteriology*, 119(3), 736–747.
- Nesterchuk, M. V., Sergiev, P. V., & Dontsova, O. A. (2011). Posttranslational Modifications of Ribosomal Proteins in *Escherichia coli*. *Acta Naturae*, 3(2), 22–33.
- Neubauer, C., Gao, Y.-G., Andersen, K. R., Dunham, C. M., Kelley, A. C., Hentschel, J., ... Brodersen, D. E. (2009). The structural basis for mRNA recognition and cleavage by the ribosome-dependent endonuclease RelE. *Cell*, 139(6), 1084–1095. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.015>
- Nikulin, A., Eliseikina, I., Tishchenko, S., Nevskaya, N., Davydova, N., Platonova, O., ... Nikonov, S. (2003). Structure of the L1 protuberance in the ribosome. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10(2), 104–108. <https://doi.org/10.1038/nsb886>
- Noller, H. F. (1991). Ribosomal RNA and Translation. *Annual Review of Biochemistry*, 60(1), 191–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.60.070191.001203>
- Noller, H. F., Lancaster, L., Zhou, J., & Mohan, S. (2017). The ribosome moves: RNA mechanics and translocation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(12), 1021–1027. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3505>
- Nyström, T. (2003). The free-radical hypothesis of aging goes prokaryotic. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(7), 1333–1341. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-2310-X>
- Nystöm, T. (1994). Role of guanosine tetraphosphate in gene expression and the survival of glucose or seryl-tRNA starved cells of *Escherichia coli* K12. *Molecular & General Genetics: MGG*, 245(3), 355–362.
- O'Connor, M., & Dahlberg, A. E. (1993). Mutations at U2555, a tRNA-protected base in 23S rRNA, affect translational fidelity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(19), 9214–9218. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.19.9214>

- O'Connor, Michael, Göringer, H. U., & Dahiberg, A. E. (1992). A ribosomal ambiguity mutation in the 530 loop of E.coli 16S rRNA. *Nucleic Acids Research*, 20(16), 4221–4227. <https://doi.org/10.1093/nar/20.16.4221>
- O'Farrell, P. H. (1978). The suppression of defective translation by ppGpp and its role in the stringent response. *Cell*, 14(3), 545–557.
- Ogle, J. M., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Tarry, M. J., Carter, A. P., & Ramakrishnan, V. (2001). Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5518), 897–902. <https://doi.org/10.1126/science.1060612>
- Ogle, James M., Murphy, F. V., Tarry, M. J., & Ramakrishnan, V. (2002). Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell*, 111(5), 721–732.
- Ortiz, J. O., Brandt, F., Matias, V. R. F., Sennels, L., Rappsilber, J., Scheres, S. H. W., ... Baumeister, W. (2010). Structure of hibernating ribosomes studied by cryoelectron tomography in vitro and in situ. *The Journal of Cell Biology*, 190(4), 613–621. <https://doi.org/10.1083/jcb.201005007>
- Owen, G. A., Pascoe, B., Kallifidas, D., & Paget, M. S. B. (2007). Zinc-Responsive Regulation of Alternative Ribosomal Protein Genes in *Streptomyces coelicolor* Involves Zur and σ^R . *Journal of Bacteriology*, 189(11), 4078–4086. <https://doi.org/10.1128/JB.01901-06>
- Page, R., & Peti, W. (2016). Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nature Chemical Biology*, 12(4), 208–214. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2044>
- Pan, T. (2013). Adaptive translation as a mechanism of stress response and adaptation. *Annual Review of Genetics*, 47, 121–137. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-111212-133522>
- Panina, E. M., Mironov, A. A., & Gelfand, M. S. (2003). Comparative genomics of bacterial zinc regulons: enhanced ion transport, pathogenesis, and rearrangement of ribosomal proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(17), 9912–9917. <https://doi.org/10.1073/pnas.1733691100>
- Patzer, S. I., & Hantke, K. (1998). The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 28(6), 1199–1210.
- Pedersen, K., Zavialov, A. V., Pavlov, M. Y., Elf, J., Gerdes, K., & Ehrenberg, M. (2003). The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell*, 112(1), 131–140.
- Petrov, A. S., Bernier, C. R., HersHKovits, E., Xue, Y., Waterbury, C. C., Hsiao, C., ... Williams, L. D. (2013). Secondary structure and domain architecture of the 23S and 5S rRNAs. *Nucleic Acids Research*, 41(15), 7522–7535. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt513>
- Phadtare, S. (2004). Recent developments in bacterial cold-shock response. *Current Issues in Molecular Biology*, 6(2), 125–136.
- Phadtare, S., & Severinov, K. (2010). RNA remodeling and gene regulation by cold shock proteins. *RNA Biology*, 7(6), 788–795.

- Plunkett, G., Burland, V., Daniels, D. L., & Blattner, F. R. (1993). Analysis of the *Escherichia coli* genome. III. DNA sequence of the region from 87.2 to 89.2 minutes. *Nucleic Acids Research*, 21(15), 3391–3398.
- Polacek, N., & Mankin, A. S. (2005). The Ribosomal Peptidyl Transferase Center: Structure, Function, Evolution, Inhibition. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 40(5), 285–311. <https://doi.org/10.1080/10409230500326334>
- Polikanov, Y. S., Blaha, G. M., & Steitz, T. A. (2012). How hibernation factors RMF, HPF, and YfiA turn off protein synthesis. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6083), 915–918. <https://doi.org/10.1126/science.1218538>
- Ramagopal, S. (1992). Are eukaryotic ribosomes heterogeneous? Affirmations on the horizon. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 70(5), 269–272.
- Ramakrishnan, V. (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*, 108(4), 557–572.
- Recht, M. I., Fourmy, D., Blanchard, S. C., Dahlquist, K. D., & Puglisi, J. D. (1996). RNA sequence determinants for aminoglycoside binding to an A-site rRNA model oligonucleotide. *Journal of Molecular Biology*, 262(4), 421–436. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0526>
- Rheinberger, H. J., & Nierhaus, K. H. (1983). Testing an alternative model for the ribosomal peptide elongation cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(14), 4213–4217.
- Rheinberger, H. J., Sternbach, H., & Nierhaus, K. H. (1981). Three tRNA binding sites on *Escherichia coli* ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(9), 5310–5314.
- Ribas de Pouplana, L., Santos, M. A. S., Zhu, J.-H., Farabaugh, P. J., & Javid, B. (2014). Protein mistranslation: friend or foe? *Trends in Biochemical Sciences*, 39(8), 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.06.002>
- Richmond, C. S., Glasner, J. D., Mau, R., Jin, H., & Blattner, F. R. (1999). Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research*, 27(19), 3821–3835.
- Robertson, W. R., Dowsett, S. J., & Hardy, S. J. (1977). Exchange of ribosomal proteins among the ribosomes of *Escherichia coli*. *Molecular & General Genetics: MGG*, 157(2), 205–214.
- Rolfe, M. D., Rice, C. J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A. D. S., ... Hinton, J. C. D. (2012). Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. *Journal of Bacteriology*, 194(3), 686–701. <https://doi.org/10.1128/JB.06112-11>
- Saint-Ruf, C., Pesut, J., Sopta, M., & Matic, I. (2007). Causes and Consequences of DNA Repair Activity Modulation During Stationary Phase in *Escherichia coli*. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 42(4), 259–270. <https://doi.org/10.1080/10409230701495599>

- Schuwirth, B. S. (2005). Structures of the Bacterial Ribosome at 3.5 Å Resolution. *Science*, 310(5749), 827–834. <https://doi.org/10.1126/science.1117230>
- Schuwirth, B. S., Borovinskaya, M. A., Hau, C. W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J. M., & Cate, J. H. (2005). Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5749), 827–834. <https://doi.org/10.1126/science.1117230>
- Selmer, M., Dunham, C. M., Murphy, F. V., Weixlbaumer, A., Petry, S., Kelley, A. C., ... Ramakrishnan, V. (2006). Structure of the 70S Ribosome Complexed with mRNA and tRNA. *Science*, 313(5795), 1935–1942. <https://doi.org/10.1126/science.1131127>
- Sharma, M. R., Dönhöfer, A., Barat, C., Marquez, V., Datta, P. P., Fucini, P., ... Agrawal, R. K. (2010). PSRP1 Is Not a Ribosomal Protein, but a Ribosome-binding Factor That Is Recycled by the Ribosome-recycling Factor (RRF) and Elongation Factor G (EF-G). *The Journal of Biological Chemistry*, 285(6), 4006–4014. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.062299>
- Sharma, M. R., Koc, E. C., Datta, P. P., Booth, T. M., Spremulli, L. L., & Agrawal, R. K. (2003). Structure of the Mammalian Mitochondrial Ribosome Reveals an Expanded Functional Role for Its Component Proteins. *Cell*, 115(1), 97–108. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00762-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00762-1)
- Simonetti, A., Marzi, S., Myasnikov, A. G., Fabbretti, A., Yusupov, M., Gualerzi, C. O., & Klaholz, B. P. (2008). Structure of the 30S translation initiation complex. *Nature*, 455(7211), 416–420. <https://doi.org/10.1038/nature07192>
- Somerville, C. R., & Ahmed, A. (1979). Mutants of Escherichia coli defective in the degradation of guanosine 5'-triphosphate, 3'-diphosphate (pppGpp). *Molecular & General Genetics: MGG*, 169(3), 315–323.
- Sørensen, M. A., Fricke, J., & Pedersen, S. (1998). Ribosomal protein S1 is required for translation of most, if not all, natural mRNAs in Escherichia coli in vivo. *Journal of Molecular Biology*, 280(4), 561–569. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1909>
- Starosta, A. L., Lassak, J., Jung, K., & Wilson, D. N. (2014). The bacterial translation stress response. *FEMS microbiology reviews*, 38(6), 1172–1201. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12083>
- Sulthana, S., Basturea, G. N., & Deutscher, M. P. (2016). Elucidation of pathways of ribosomal RNA degradation: an essential role for RNase E. *RNA*, 22(8), 1163–1171. <https://doi.org/10.1261/rna.056275.116>
- Zaher, H. S., & Green, R. (2009). Fidelity at the molecular level: lessons from protein synthesis. *Cell*, 136(4), 746–762. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.036>
- Zhang, J., Zhang, Y., & Inouye, M. (2003). Characterization of the interactions within the mazEF addiction module of Escherichia coli. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(34), 32300–32306. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304767200>
- Tama, F., Valle, M., Frank, J., & Brooks, C. L. (2003). Dynamic reorganization of the functionally active ribosome explored by normal mode analysis and cryo-electron microscopy.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(16), 9319–9323. <https://doi.org/10.1073/pnas.1632476100>

Uchida, T., Abe, M., Matsuo, K., & Yoneda, M. (1970). Amounts of free 70S ribosomes and ribosomal subunits found in *Escherichia coli* at various temperatures. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 41(4), 1048–1054. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(70\)90191-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(70)90191-9)

Ueta, M., Ohniwa, R. L., Yoshida, H., Maki, Y., Wada, C., & Wada, A. (2008). Role of HPF (hibernation promoting factor) in translational activity in *Escherichia coli*. *Journal of Biochemistry*, 143(3), 425–433. <https://doi.org/10.1093/jb/mvm243>

Ueta, M., Wada, C., Bessho, Y., Maeda, M., & Wada, A. (2017). Ribosomal protein L31 in *Escherichia coli* contributes to ribosome subunit association and translation, whereas short L31 cleaved by protease 7 reduces both activities. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 22(5), 452–471. <https://doi.org/10.1111/gtc.12488>

Ueta, M., Yoshida, H., Wada, C., Baba, T., Mori, H., & Wada, A. (2005). Ribosome binding proteins YhbH and YfiA have opposite functions during 100S formation in the stationary phase of *Escherichia coli*. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 10(12), 1103–1112. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2005.00903.x>

van Duin, J., & van Knippenberg, P. H. (1974). Functional heterogeneity of the 30 S ribosomal subunit of *Escherichia coli*. 3. Requirement of protein S1 for translation. *Journal of Molecular Biology*, 84(1), 185–195.

van Knippenberg, P. H., Hooykaas, P. J., & van Duin, J. (1974). The stoichiometry of *E. coli* 30S ribosomal protein S1 on in vivo and in vitro polyribosomes. *FEBS Letters*, 41(2), 323–326.

Vesper, O., Amitai, S., Belitsky, M., Byrgazov, K., Kaberdina, A. C., Engelberg-Kulka, H., & Moll, I. (2011). Selective translation of leaderless mRNAs by specialized ribosomes generated by MazF in *Escherichia coli*. *Cell*, 147(1), 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.047>

Vila-Sanjurjo, A., Schuwirth, B.-S., Hau, C. W., & Cate, J. H. D. (2004). Structural basis for the control of translation initiation during stress. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(11), 1054–1059. <https://doi.org/10.1038/nsmb850>

Wada, A. (1998). Growth phase coupled modulation of *Escherichia coli* ribosomes. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 3(4), 203–208.

Weber, H. J. (1972). Stoichiometric measurements of 30S and 50S ribosomal proteins from *Escherichia coli*. *Molecular & General Genetics: MGG*, 119(3), 233–248.

Wei, Y., Ye, L., Li, Y., Yang, F., Liu, D., Guo, X., ... Liu, C. (2016). Functional characterization of RelBE toxin–antitoxin system in probiotic *Bifidobacterium longum* JDM301. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 48(8), 741–749. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmw056>

Wilson, D. N., & Nierhaus, K. H. (2005). Ribosomal proteins in the spotlight. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 40(5), 243–267. <https://doi.org/10.1080/10409230500256523>

Wilson, D. N., Schlutzen, F., Harms, J. M., Yoshida, T., Ohkubo, T., Albrecht, R., ... & Fucini, P. (2005). X-ray crystallography study on ribosome recycling: the mechanism of binding and action of RRF on the 50S ribosomal subunit. *The EMBO journal*, 24(2), 251-260.

Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vonrhein, C., ... Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, 407(6802), 327–339. <https://doi.org/10.1038/35030006>

Wittmann, H. G. (1982). Components of bacterial ribosomes. *Annual Review of Biochemistry*, 51, 155–183. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.51.070182.001103>

Yonath, A. (2002). The search and its outcome: high-resolution structures of ribosomal particles from mesophilic, thermophilic, and halophilic bacteria at various functional states. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 31, 257–273. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.31.082901.134439>

Yoshida, H., Maki, Y., Kato, H., Fujisawa, H., Izutsu, K., Wada, C., & Wada, A. (2002). The ribosome modulation factor (RMF) binding site on the 100S ribosome of *Escherichia coli*. *Journal of Biochemistry*, 132(6), 983–989.

Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H., & Noller, H. F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5518), 883–896. <https://doi.org/10.1126/science.1060089>

Yusupova, G. Z., Yusupov, M. M., Cate, J. H. D., & Noller, H. F. (2001). The Path of Messenger RNA through the Ribosome. *Cell*, 106(2), 233–241. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00435-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00435-4)

Töös kasutatud raamatud:

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual pg A2.2. (Cold spring Harbor Laboratory Press, New York, ed.3, vol 3., 2001).

Tobin Kahrstrom, Christina & I. Andersson, Dan & Sanyal, Suparna. (2012). Comprehending a Molecular Conundrum: Functional Studies of Ribosomal Protein Mutants from *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. Pg 453 - 480. 10.5772/30856.

Töös kasutatud veebiaadressid:

<http://www.uniprot.org/>

LIHTLITSENTS

Mina, Pavel Volõnkin

(sünnikuupäev:

20.02.1993)

1. Annan Tartu Ülikooli tasuta loa (lihtlitsents) enda loodud teose

Escherichia coli ribosoomi valgu bL31 paraloogide tähtsusest stressitingimustel

Mille juhendaja on Aivar Liiv, *Ph.D* ja Silva Lilleorg *MSc*

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2018